



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA MEDICINAL E MODELAGEM  
MOLECULAR  
LABORATÓRIO AMAZÔNICO DE COMPUTAÇÃO CIENTÍFICA**

**AMANDA RUSLANA SANTANA OLIVEIRA**

**Aspectos teóricos da interação entre compostos cefalosporínicos e  
a Proteína 5 de Ligação à Penicilina de *Escherichia coli* usando  
Dinâmica Molecular**

**Belém  
2017**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA MEDICINAL E MODELAGEM  
MOLECULAR  
LABORATÓRIO AMAZÔNICO DE COMPUTAÇÃO CIENTÍFICA**

**AMANDA RUSLANA SANTANA OLIVEIRA**

**Aspectos teóricos da interação entre compostos cefalosporínicos e  
a Proteína 5 de Ligação à Penicilina de *Escherichia coli* usando  
Dinâmica Molecular**

**Defesa de Mestrado apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Química Medicinal e  
Modelagem Molecular como requisito para a  
obtenção do grau de Mestre em Química  
Medicinal e Modelagem Molecular.  
Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Lima  
Barros.**

**Belém  
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará  
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- O48a Oliveira, Amanda Ruslana Santana  
Aspectos Teóricos da Interação entre Compostos Cefalosporínicos e a Proteína 5 de Ligação à Penicilina de *Escherichia coli* usando Dinâmica Molecular / Amanda Ruslana Santana Oliveira. - 2017.  
92 f. : il. color.
- Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Química Medicinal e Modelagem Molecular (PPGQM3), Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, 2017.  
Orientação: Prof. Dr. Carlos Augusto Lima Barros  
Coorientação: Prof. Dr. Agnaldo da Silva Carneiro.
1. *E. coli*. 2. Cefalosporinas. 3. Peptidoglicano. 4. Dinâmica Molecular. 5. PBP5. I. Barros, Carlos Augusto Lima, *orient.* II. Título
- 

CDD 541.2

**AMANDA RUSLANA SANTANA OLIVEIRA**

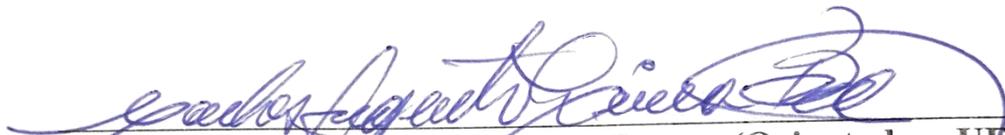
**Aspectos teóricos da interação entre compostos cefalosporínicos e a Proteína 5 de Ligação à Penicilina de *Escherichia coli* usando Dinâmica Molecular**

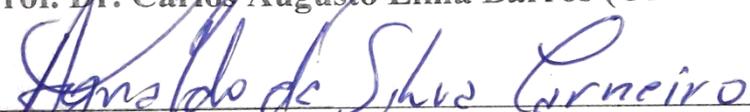
**Defesa de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Medicinal e Modelagem Molecular como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Química Medicinal e Modelagem Molecular.  
Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Lima Barros.**

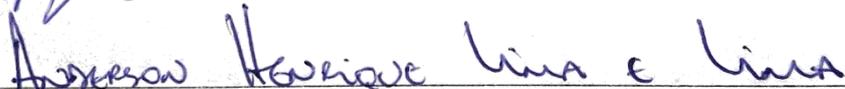
Data da Apresentação: 04/08/2018

Conceito: **APROVADO**

**Banca Examinadora**

  
Prof. Dr. Carlos Augusto Lima Barros (Orientador- UFPA)

  
Prof. Dr. Agnaldo da Silva Carneiro (Membro Interno-UFPA)

  
Prof. Dr. Anderson Henrique Lima e Lima (Membro Externo-UFPA)

## AGRADECIMENTOS

À Deus por tudo que Ele representa em minha vida, me amparando em momentos de dor e me guiando em momentos de dúvidas, os quais me fizeram chegar onde eu cheguei e ser quem eu sou.

Aos meus pais, Eduardo Neves e Lucenilde Neves, por toda educação, amor e apoio dedicados, e à minha irmã, Cristiana Karise, e meu primo, Guilherme Santana, pelo companheirismo, pela presença nos momentos difíceis e pelo carinho.

Ao meu orientador, Dr. Carlos Augusto Lima Barros, por toda paciência e confiança conferidos a mim e ao meu trabalho.

À Universidade Federal do Pará – UFPA pelo apoio ao desenvolvimento científico.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química Medicinal e Modelagem Molecular – PPGQMMM pela oportunidade de realizar esta pós-graduação.

Ao professor Dr. Jeronimo Lameira Silva pela excelente coordenação do PPGQMMM durante o período deste mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES / FAPESPA pelo auxílio financeiro concedido durante a realização da pesquisa.

Ao Laboratório Amazônico de Computação Científica – LACC UFPA pelo acolhimento para a execução desta pesquisa.

Ao Laboratório Computacional de Sistemas Biológicos – LCSB UFPA e ao seu coordenador, professor Dr. Agnaldo da Silva Carneiro, que me ajudou a conduzir este trabalho com muita paciência, competência e companheirismo.

Ao Laboratório de Química Computacional – LQC UFPA e ao seu coordenador, professor Dr. Ricardo Miranda, por manter a parceria desde a Iniciação Científica e durante a execução deste trabalho.

Aos professores Antonio Florêncio, Edison Almeida e João Elias, os quais conduziram diretamente minhas experiências desde a graduação e durante a Iniciação Científica, agradeço pelas orientações, pela confiança, pelo apoio e pela amizade que perduram.

Aos meus colegas, Jéssica Araújo, Rutelene Natanaele e Fábio Jorge, pelas experiências divididas, pelas contribuições e pelo carinho.

Ao meu namorado, Claubert Henrique, pelos ensinamentos e contribuições, pela paciência e amizade, por todas as noites em claro dedicadas à mútua ajuda, por sempre me estender a mão e não me deixar desistir, por ser esse homem maravilhoso e principalmente pelo amor. Obrigada por tudo. Eu amo você.

Às minhas tias e tios, avós maternos, avós paternos (*in memoriam*) e demais primos pela base e amor familiar.

À todos que direta e indiretamente estão fazendo parte desta trajetória.

Muito obrigada!

“Não é na ciência que está a felicidade, mas na aquisição da ciência”.

(Edgar Allan Poe)

## RESUMO

A *Escherichia coli* é um bacilo Gram-negativo anaeróbico que naturalmente habita o intestino de mamíferos. As doenças surgem quando a bactéria alcança outros órgãos do nosso corpo, causando infecções, principalmente no trato urinário de mulheres, devido à proximidade da uretra feminina com o ânus. No tratamento destas infecções são usados antibióticos que combatem a bactéria, tais como antibióticos da classe de cefalosporinas, que constituem o grupo com o maior número de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em uso clínico. Estes compostos são capazes de inibir a função enzimática das Proteínas de Ligação à Penicilina (PBP, do inglês *Penicillin-Binding Proteins*), que é responsável pela etapa final de biossíntese do peptidoglicano, componente essencial para a sobrevivência das bactérias. Neste trabalho, os compostos antimicrobianos cefoxitina, cefuroxima, cefotaxima, cefalotina, cefixima, cefmetazole e ácido 7-aminocefalosporânico, foram escolhidos com base em estudos experimentais de atividade biológica no combate ao patógeno oportunista Gram-negativo *Pseudomonas aeruginosa*, para serem estudados teoricamente, por meio de simulações de Dinâmica Molecular (DM), cálculos de energia livre de ligação e energia de interação por resíduo, para a determinação de sua potencial atividade biológica na inibição da função enzimática da PBP específica de *E. coli*, a Proteína 5 de Ligação à Penicilina (PBP5), portanto, sua inibição leva à morte celular. Foram obtidas energias livres de ligação mais favoráveis para os ligantes cefoxitina, cefalotina e cefuroxima, -31,471 Kcal/mol, -34,225 Kcal/mol e -35,085 Kcal/mol, respectivamente, e observou-se que os resíduos catalíticos Ser44 e His216 apresentaram contribuições energéticas mais favoráveis para o sistema formado pelo ligante cefalotina. Assim, sugere-se que a cefalotina tem excelente potencial para a inibição da função enzimática da PBP5 de *E. coli*, responsável pela fase final de transpeptidação da camada de peptidoglicano.

**Palavras-chave:** *E. coli*, Cefalosporinas, peptidoglicano, Dinâmica Molecular, PBP5.

## ABSTRACT

*Escherichia coli* is an anaerobic Gram-negative bacillus that naturally inhabits the intestines of mammals. The diseases arise when the bacteria reaches other organs of our body, causing infections, mainly in the urinary tract of women, due to the proximity of the female urethra with the anus. Antibiotics were used in the treatment of these infections, such as antibiotics of the cephalosporin class, which are the group with the highest number of  $\beta$ -lactam antibiotics in clinical use. These compounds can inhibit the enzymatic function of Penicillin-Binding Proteins (PBP), which is responsible for the final step of biosynthesis of peptidoglycan, an essential component for the survival of bacteria. In this work, the antimicrobial compounds cefoxitin, cefuroxime, cefotaxime, cephalothin, cefixime, cefmetazole and 7-aminocephalosporanic acid were chosen based on experimental studies of biological activity in the fight against the opportunistic Gram-negative pathogen *Pseudomonas aeruginosa*, to be studied theoretically through Molecular Dynamics simulations, binding free energy calculations, and interaction energy per residue, for the determination of their potential biological activity in inhibiting the enzymatic function of *E. coli* specific PBP, Penicillin Binding Protein 5 (PBP5), therefore its inhibition leads to cell death. More favorable binding free energies were obtained for the cefoxitin (crystallographic), cephalothin and cefuroxime ligands, -31.471 Kcal/mol, -34.225 Kcal/mol and -35.085 Kcal/mol, respectively, and it was observed that the catalytic residues Ser44 and His216 presented more favorable energy contributions to the system formed by the cephalothin ligand. Thus, it was suggested that cephalothin has excellent potential for inhibition of the enzymatic function of *E. coli* PBP5, responsible for the final phase of transpeptidation of the peptidoglycan layer.

**Keywords:** *E. coli*, Cephalosporins, peptidoglycan, Molecular Dynamic, PBP5.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Estrutura bacteriana, modelo <i>Escherichia coli</i> .....	15
<b>Figura 2</b> – Procedimento da coloração de Gram .....	16
<b>Figura 3</b> – Constituição estrutural da parede celular de bactérias Gram positivas e Gram negativas .....	17
<b>Figura 4</b> – Formação da estrutura do peptidoglicano; A) unidades monoméricas de peptidoglicano: dissacarídeo de GlcNAc e MurNAc; péptido de L-alanina, D-glutamato, o aminoácido em destaque é o meso-DAP (m-DAP) presente na maioria das bactérias Gram-negativas (ou L-lisina na maioria das bactérias Gram-positivas); B) ligação cruzada de m-DAP com D-alanina de outra unidade monomérica de peptidoglicano .....	20
<b>Figura 5</b> – Estrutura tridimensional a proteína 3MZE .....	21
<b>Figura 6</b> – (a) mecanismo catalisado pela transpeptidase para a formação cruzada entre cadeias peptídicas da parede celular bacteriana; (b) inibição irreversível da transpeptidase por antibióticos $\beta$ -lactâmicos ...	22
<b>Figura 7</b> – Semelhança estrutural entre D-alanil-D-alanina e Cefalosporina .....	23
<b>Figura 8</b> – (a) estrutura das penicilinas; (b) estrutura das cefalosporinas .....	28
<b>Figura 9</b> – (a) clivagem da ligação do anel $\beta$ -lactâmico por uma $\beta$ -lactamase; (b) ácido clavulânico e (c) sulbactam .....	29
<b>Figura 10</b> – Estruturas dos cefalosporínicos: (a) cefoxitina; (b) cefuroxima; (c) cefotaxima; (d) cefalotina; (e) cefixima; (f) cefmetazole; (g) 7-ACA .....	31
<b>Figura 11</b> – a) estrutura da proteína 3MZE destacando as regiões de maior flutuação; b) gráfico de RMSF (Å) para os receptores em cada um dos sete sistemas .....	42
<b>Figura 12</b> – a) complexo enzimático da PBP5 e a estrutura do ligante 7-ACA em pontos diferentes da DM; b) resíduos catalíticos Ser44, His216 e Arg148 e a estrutura do 7-ACA no início da DM (cor laranja), aos 35ns (cor verde), aos 45 ns (cor azul) e aos 50ns (cor rosa) .....	46
<b>Figura 13</b> – Mudanças conformacionais ao longo das interações; (a) Ser44 catalítica com o ligante cristalográfico cefoxitina; (b) His216 catalítica com a cefoxitina .....	50
<b>Figura 14</b> – Estrutura do ligante cefotaxima antes dos 33 ns (cor rosa) e depois dos 33 ns (cor verde) .....	54
<b>Figura 15</b> – Interação entre o resíduo catalítico Arg248 e o ligante cefotaxima (cor rosa) .....	56
<b>Figura 16</b> – Resíduos catalíticos Ser44 e His216 (cor amarelo) e a estrutura do ligante cefotaxima (cor rosa) em diferentes momentos da dinâmica molecular; a) no início da DM; b) 33 ns; c) 41 ns; d) 42 ns e e) 50ns ..	58
<b>Figura 17</b> – Interação entre o resíduo Thr214 e o ligante cefmetazole; a) ligante com estrutura aberta aos 22 ns (cor laranja) e estrutura fechada aos 40 ns (cor azul) .....	64
<b>Figura 18</b> – Comparação da estrutura do ligante cefixima em diferentes momentos da dinâmica molecular; a) conformação do início da DM (cor rosa) e em 4 ns (cor verde claro); b) início da DM (cor rosa) e em 20 ns (cor azul); c) início da DM (cor rosa) e em 30 ns (cor verde escuro); d) início da DM (cor rosa) e em 43 ns (cor azul); e) início da DM (cor rosa) e em 50ns (cor verde) .....	66

<b>Figura 19</b> – Mudança conformacional ocorrida em aproximadamente 25 ns de DM; (a) estrutura dos resíduos do sítio ativo de ligação antes (cor azul) e depois (cor rosa) da mudança conformacional; (b) estrutura do ligante cefalotina antes (cor azul) e depois (cor rosa) da mudança conformacional .....	70
<b>Figura 20</b> – Estrutura dos resíduos do sítio ativo e do ligante cefuroxima antes da mudança conformacional (cor azul) e após a mudança conformacional (cor amarela) aos 25 ns .....	77
<b>Figura 21</b> – Energia QMMMGBSA para a interação entre a Ser44 catalítica e o ligante cristalográfico cefoxitina .....	80

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b> – RMSD (em Å) da estrutura do receptor de 4-355 (em preto) e dos resíduos do domínio PB 16-262 (em verde escuro) <i>versus</i> tempo de DM (em ns) .....	43
<b>Gráfico 2</b> – Distâncias (em Å) em relação ao tempo de simulação (em ns) das interações do ligante 7-ACA com os aminoácidos Ser44, His216 e Arg245(N1-O2) .....	44
<b>Gráfico 3</b> – RMSD (em Å) do sistema 3MZE e o ligante cristalográfico cefoxitina <i>versus</i> o tempo de DM (em ns) .....	47
<b>Gráfico 4</b> – Distâncias de interação (em Å) com o ligante cristalográfico cefoxitina <i>versus</i> tempo de DM (em ns) .....	48
<b>Gráfico 5</b> – Energias de interação ( $E_{int}$ , em Kcal/mol) entre os resíduos da 3MZE e o ligante cristalográfico cefoxitina .....	52
<b>Gráfico 6</b> – RMSD (em Å) do sistema 3MZE e o ligante cefotaxima <i>versus</i> o tempo de DM (em ns) .....	53
<b>Gráfico 7</b> – Distâncias de interação (em Å) com a cefotaxima <i>versus</i> tempo de DM (em ns) .....	55
<b>Gráfico 8</b> – Energias de interação ( $E_{int}$ , em Kcal/mol) entre os resíduos da 3MZE e o ligante cefotaxima .....	59
<b>Gráfico 9</b> – RMSD (em Å) do sistema 3MZE e o ligante cefmetazole <i>versus</i> o tempo de DM (em ns) .....	60
<b>Gráfico 10</b> – Distâncias de interação (em Å) com a cefmetazole <i>versus</i> tempo de DM (em ns) .....	61
<b>Gráfico 11</b> – Energias de interação ( $E_{int}$ , em Kcal/mol) entre os resíduos da 3MZE e o ligante cefmetazole .....	63
<b>Gráfico 12</b> – RMSD (em Å) do sistema 3MZE e o ligante cefixima <i>versus</i> o tempo de DM (em ns) .....	65
<b>Gráfico 13</b> – Distâncias de interação (em Å) com a cefixima <i>versus</i> tempo de DM (em ns) .....	67
<b>Gráfico 14</b> – Energias de interação ( $E_{int}$ , em Kcal/mol) entre os resíduos da 3MZE e o ligante cefixima .....	68
<b>Gráfico 15</b> – RMSD (em Å) do sistema 3MZE e o ligante cefalotina <i>versus</i> o tempo de DM (em ns) .....	69
<b>Gráfico 16</b> – Distâncias de interação (em Å) com a cefalotina <i>versus</i> tempo de DM (em ns) .....	72
<b>Gráfico 17</b> – Energias de interação ( $E_{int}$ , em Kcal/mol) entre os resíduos da 3MZE e o ligante cefalotina .....	74
<b>Gráfico 18</b> – RMSD (em Å) do sistema 3MZE e o ligante cefuroxima <i>versus</i> o tempo de DM (em ns) .....	76
<b>Gráfico 19</b> – Distâncias de interação (em Å) com a cefuroxima <i>versus</i> tempo de DM (em ns) .....	78
<b>Gráfico 20</b> – Energias de interação ( $E_{int}$ , em Kcal/mol) entre os resíduos da 3MZE e o ligante cefuroxima .....	79
<b>Gráfico 21</b> – Energia Livre de Ligação <i>versus</i> tempo de DM (em frames) do sistema com o ligante cefoxitina .....	82
<b>Gráfico 22</b> – Energia Livre de Ligação <i>versus</i> tempo de DM (em frames) do sistema com o ligante cefalotina .....	83
<b>Gráfico 23</b> – Energia Livre de Ligação <i>versus</i> tempo de DM (em frames) do sistema com o ligante cefuroxima .....	84

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Distâncias de interação (em Å) entre os resíduos catalíticos da 3MZE e a cefoxitina .....	51
<b>Tabela 2</b> – Distâncias de interação (em Å) entre os resíduos catalíticos da 3MZE e o ligante cefotaxima .....	57
<b>Tabela 3</b> – Distâncias de interação (em Å) entre os resíduos catalíticos da 3MZE e o ligante cefmetazole .....	62
<b>Tabela 4</b> – Energias de interação por resíduo (em Kcal/mol) e $\Delta G$ do sistema formado pelo ligante cefalotina .....	75
<b>Tabela 5</b> – Energias livres de ligação ( $\Delta G_{bind}$ , em Kcal/mol) para os ligantes cefoxitina, cefalotina e cefuroxima .....	85

## LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

Å	Angstrom
β	Beta
μm	Micromolar
AMBER	Construção Assistida de Modelos com Refinamento de Energia ( <i>Assisted Model Building with Energy Refinement</i> )
CV	<i>Crystal Violet</i> (violeta de genciana)
CV-I	Complexo <i>Crystal Violet-Iodine</i>
DM	Dinâmica Molecular
ΔG	Variação de Energia Livre de Ligação pelo Método MMGBSA
ΔG <sub>bind</sub>	Variação de Energia Livre de Ligação
ΔG <sub>elec</sub>	Variação de Energia Eletrostática
ΔG <sub>GB</sub>	Variação de Energia Polar
ΔG <sub>nonpolar</sub>	Variação de Energia Apolar
ΔG <sub>vdw</sub>	Variação de Energia de Van der Waals
ΔG <sub>solv</sub>	Variação de Energia de Solvatação
E <sub>int</sub>	Energia de Interação
E <sub>PM3-ΔG</sub>	Variação de Energia pelo Método PM3
GlcNac	N-acetilglucosamina (derivado da glicosamina)
I	<i>Iodine</i> (solução de lugol)
ITC	Calorimetria de Titulação Isotérmica
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada ( <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> )
LPS	Lipopolissacarídeos (constituído de um lipídio e um polissacarídeo ligados por uma ligação covalente)
MurNAc	Ácido N-acetilmurâmico (derivado da glicosamina e ácido láctico)
MM	Mecânica Molecular
MMGBSA	<i>Molecular Mechanics of Generalized Born Surface Area</i>
ns	Nanosegundos
PBP	Proteínas de Ligação à Penicilina ( <i>Penicillin-Binding Proteins</i> )
PBP5	Proteína 5 de Ligação à Penicilina
PDB	Banco de Dados de Proteínas ( <i>Protein Data Bank</i> )
ps	Picosegundos
OMS	Organização Mundial da Saúde
RESP	<i>Restrained Electrostatic Potentials</i>
RMSD	Desvio quadrático médio ( <i>Root Mean Square Deviation</i> )
RMSF	Flutuação quadrática média ( <i>Root Mean Squared Fluctuation</i> )
V <sub>(r)</sub>	Energia potencial total
VLDL	Lipoproteínas de densidade muito baixa ( <i>very low density lipoprotein</i> )
VMD	<i>Visual Molecular Dynamics</i>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Bactérias .....</b>	<b>15</b>
2.1.1 Técnica de Gram .....	16
2.1.2 Parede celular bacteriana .....	17
2.1.3 Peptidoglicano .....	18
2.1.4 Proteína de Ligação à Penicilina (PBP) .....	21
2.1.5 <i>Escherichia coli</i> .....	23
<b>2.2 Antibióticos .....</b>	<b>25</b>
2.2.1 Cefalosporinas .....	29
2.2.2 Escolha dos ligantes .....	30
2.2.3 Ligantes .....	30
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>32</b>
3.1 Objetivo geral .....	32
3.2 Objetivos específicos .....	32
<b>4 MÉTODOS COMPUTACIONAIS .....</b>	<b>33</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>41</b>
5.1 RMSF .....	41
5.2 Sistema com o ligante ácido 7-aminocefalosporânico (7-ACA) .....	44
5.3 RMSD e Decomposição .....	47
5.3.1 Ligante cristalográfico cefoxitina .....	47
5.3.2 Ligante cefotaxima .....	53
5.3.3 Ligante cefmetazole .....	60
5.3.4 Ligante cefixima .....	64
5.3.5 Ligante cefalotina .....	69
5.3.6 Ligante cefuroxima .....	76
5.4 MM/GBSA e QMMM/GBSA .....	80
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>86</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>88</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As Proteínas de Ligação à Penicilina (*Penicillin-Binding Protein*, PBP) são uma família de acil-serina-transferases, ou transpeptidases bacterianas, que têm a função de catalisar as ligações peptídicas cruzadas entre as fitas glicosídicas, através da ação de um resíduo de serina em seus sítios ativos, no processo final de biossíntese das camadas de peptidoglicano da parede celular bacteriana (DEN BLAAUWEN et al., 2008; POTLURI et al., 2010). Elas constituem um grupo de proteínas de alta afinidade de ligação à antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, os quais têm capacidade de inibir sua função enzimática ligando-se covalentemente ao resíduo de serina do seu sítio ativo de ligação (SAUVAGE et al., 2008; ZAPUN t al., 2008).

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos podem ser classificados como bactericidas, quando causam a morte da bactéria, ou bacteriostáticos, quando promovem a inibição do crescimento microbiano (WALSH, 2003).

O peptidoglicano, também conhecido como mureína, é um polímero formado por açúcares e aminoácidos, chamados *N*-acetilglucosamina (GlcNac) e ácido *N*-acetilmurâmico (MurNac), unidos por ligações cruzadas ( $\beta$ -1,4) entre os aminoácidos de diferentes cadeias de peptídeos, resultando em um polímero tridimensional forte e rígido, que formam uma camada semelhante a uma malha na parte externa à membrana citoplasmática da bactéria, que constitui parte da parede celular bacteriana. As ligações cruzadas, conhecidas como transpeptidação, são catalisadas pelas enzimas transpeptidases. A camada de peptidoglicano é estruturalmente mais espessa em bactérias Gram positivas, representando aproximadamente 90% do peso total da bactéria, em comparação aos 5-10% em Gram negativas, que tem a parede celular estrutural e quimicamente mais complexa.

A *Escherichia coli* é uma enterobactéria Gram negativa e anaeróbica que habita naturalmente o intestino de mamíferos. Pode causar doenças quando alcança outros órgãos do nosso corpo, causando infecções, principalmente no trato urinário de mulheres, devido à proximidade da uretra feminina com o ânus. A infecção por *E. coli* pode ocorrer através do consumo de água ou de alimentos contaminados por coliformes fecais contendo a bactéria. No tratamento destas infecções utiliza-se de antibióticos que combatem a bactéria, tais como antibióticos da classe de cefalosporinas.

A PBP majoritária da bactéria em *Escherichia coli* é a Proteína 5 de Ligação à Penicilina, PBP5 (NICHOLAS et al., 2003), encontrada sob o código 3MZE (NICOLA

et al., 2010) no Banco de Dados de Proteínas (*Protein Data Bank*, PDB) (H. M. Berman et al., 2000). A interação destas enzimas com antibióticos  $\beta$ -lactâmicos inativa sua função, inviabilizando a fase final de biossíntese do peptidoglicano, formando um peptidoglicano fracamente reticulado, e ocasionando irregularidades na estrutura da parede celular, que faz com que as bactérias cresçam altamente suscetíveis à lise e morte celular (WILKE et al., 2005).

A potencial atividade biológica dos compostos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos no combate à *E. coli* através da inibição da PBP5 está baseada na atividade biológica comprovada experimentalmente contra a bactéria, também Gram negativa, *Pseudomonas aeruginosa*, de acordo com os estudos experimentais realizados por Majorek et al., em 2013, um patógeno oportunista que explora eventuais fraquezas do organismo para estabelecer um quadro de infecção. Portanto, a PBP5 é um alvo promissor no tratamento de infecções causadas por *E. coli*, pois a inibição desta proteína através da interação com antibióticos  $\beta$ -lactâmicos pode causar a morte da bactéria.

Este trabalho tem por finalidade realizar estudos teórico-computacionais dos compostos cefoxitina, cefuroxima, cefotaxima, cefalotina, cefixima, cefmetazole e o ácido 7-aminocefalosporânico, na inibição da função enzimática da PBP5 de *E. coli*, verificando as principais interações que estabilizam os compostos no sítio ativo da PBP5, por meio de simulações de Dinâmica Molecular (DM), gráficos de desvio quadrático médio (RMSD) e flutuação quadrática média (RMSF) utilizados como método de análise de estabilidade da estrutura proteica e das variações conformacionais durante a simulação, juntamente com o cálculo de energia livre de ligação e energia de interação por resíduos, que permitem avaliar a estabilidade e espontaneidade dos complexos e determinar quais os resíduos contribuem favoravelmente para o sistema. Os resultados apresentados deverão contribuir para o melhor entendimento das principais interações ocorridas entre os antimicrobianos e os resíduos do sítio ativo de ligação da transpeptidase de *E. coli*, e dará suporte para sugerir o inibidor cefalosporínico mais estável para a inibição da ação enzimática da PBP5.

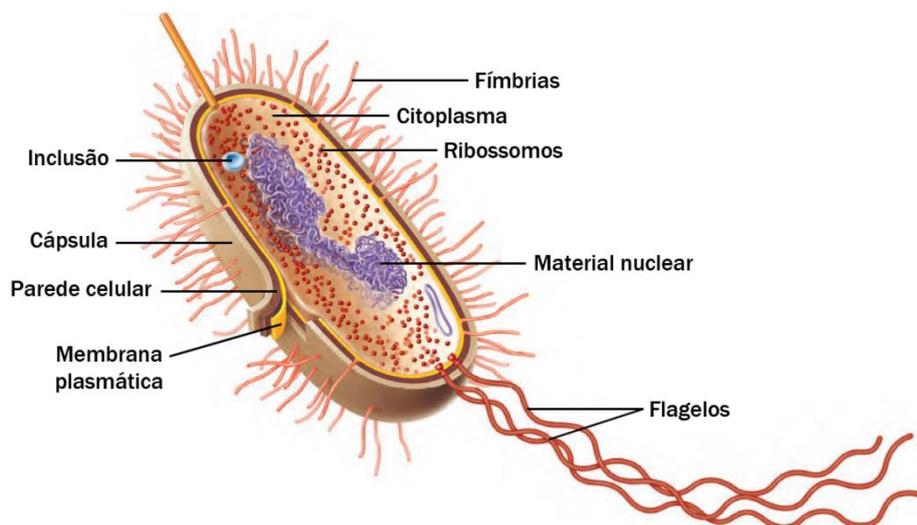
## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Bactérias

As bactérias são microrganismos procariotos que podem se apresentar isolados ou reunidos com outros microrganismos constituindo as colônias. O tamanho de sua célula pode variar entre 0,2 a 2  $\mu\text{m}$  de diâmetro e de 2 a 8  $\mu\text{m}$  de comprimento (KAYSER et al., 2005; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). São seres unicelulares de estrutura simples pertencentes ao reino Monera, segundo Robert Harding Whittaker (1920 - 1980), um biólogo norte-americano, que propôs em 1969 a classificação dos organismos em cinco diferentes reinos (MURRAY, 2005).

Elas apresentam organização celular simplificada, sem organelas. São simplesmente constituídas por uma parede celular, membrana plasmática, citoplasma, material nuclear, ribossomos e as estruturas não essenciais tais como cápsula/glicocálice, flagelo, fímbrias e inclusões (Figura 1). As estruturas essenciais são consideradas como sendo aquelas indispensáveis à multiplicação microbiana, enquanto as estruturas não essenciais são encontradas apenas em algumas bactérias e não interferem na multiplicação das mesmas (MIMS et al., 1995; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

**Figura 1** – Estrutura bacteriana, modelo *Escherichia coli*



**Fonte:** adaptado de TORTORA; FUNKE; CASE, 2012.

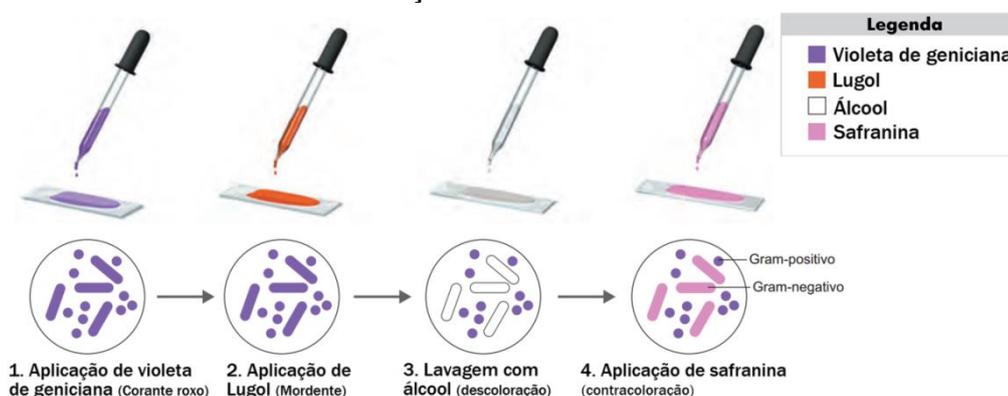
As bactérias se diferenciam pela estrutura da parede celular, seus componentes e suas funções. Sua composição química variável determina a existência de grupos de bactérias denominadas de Gram positivas e Gram negativas. Esta é uma divisão empírica clássica que revela diferenças importantes

na composição química e na estrutura da parede celular (BARBOZA; TORRES, 2005; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2006).

### 2.1.1 Técnica de Gram

Esses dois grupos de bactérias são determinados a partir da técnica de coloração de Gram, descoberta em 1884, pelo físico dinamarquês Hans Christian Joachim Gram, que permite à bacteriologia a distinção entre bactérias Gram positivas e Gram negativas. A técnica, detalhada na figura 2, consiste em corar as amostras de bactérias inicialmente com violeta de genciana (*Crystal Violet*, CV), onde as amostras irão apresentar-se coradas em violeta. Em seguida aplica-se a solução de Lugol (solução em equilíbrio de iodo, I<sub>2</sub> (1%), e iodeto de potássio, KI (2%),) (*Iodine*, I), em ambas as amostra de bactérias haverá formação do complexo *Crystal Violet-Iodine* (CV-I) no interior das células, que permanecerão violeta, pois o ligol é um mordente que tem a função específica de manter a durabilidade da cor. O terceiro passo é a aplicação do álcool-acetona (*Alcohol*), na amostra de bactérias Gram positiva ocorrerá desidratação da parede celular e diminuição da porosidade e da permeabilidade, o complexo CV-I não poderá sair da célula, que permanece violeta, enquanto que na amostra de bactérias Gram negativa acontecerá a extração dos lipídeos da parede celular e aumento da porosidade, o complexo CV-I é removido da célula, que é descorada. Por último, faz-se a aplicação do corante safranina (solução de rosanilina e pararosanilina) (*Safranin*) que permite a diferenciação por contracoloração, pois na amostra de Gram positivas a célula não é afetada, permanecendo violeta, já na amostra de Gram negativa a célula adquire o corante, tornando-se rosa-vermelha.

**Figura 2** – Procedimento da coloração de Gram



**Fonte:** adaptado de TORTORA; FUNKE; CASE, 2012.

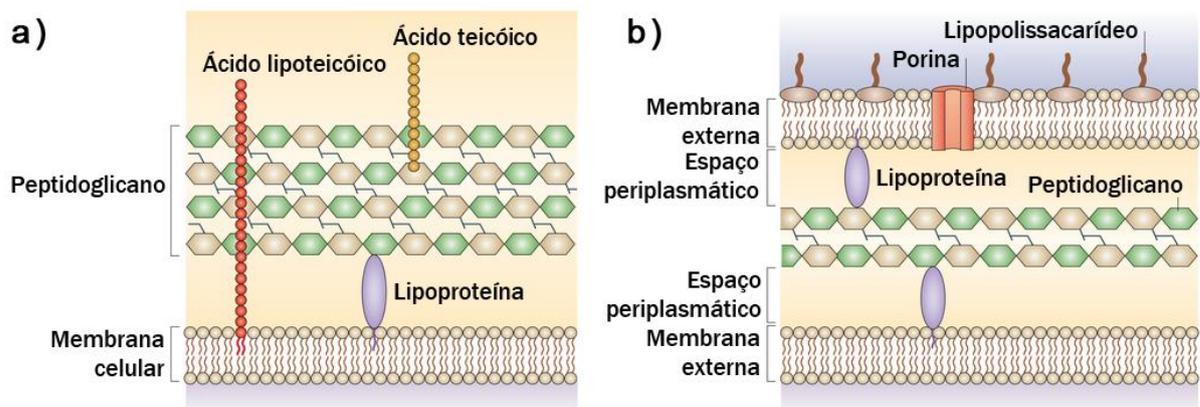
### 2.1.2 Parede celular bacteriana

É a estrutura presente na maioria das bactérias conhecidas, circunda a frágil membrana plasmática e corresponde a uma das estruturas mais importantes nas células bacterianas. Devido à sua rigidez, promove a manutenção da forma do microrganismo, conferindo às bactérias a resistência necessária para suportar a elevada pressão osmótica de seu interior e também participa nos processos de divisão celular, transporte de substâncias e fenômenos patogênicos, em decorrência de presença de componentes que favorecem sua patogenicidade, tais como antígenos ou moléculas envolvidas no reconhecimento celular (VON NUSSBAUM et al., 2006).

A parede celular bacteriana é composta por uma camada interna de peptidoglicano, envolta por uma membrana externa, que varia em espessura e em composição química dependendo do tipo de bactéria (LEVINSON; JAWETZ et al., 1998, KONEMAN et al., 2001). Sua resistência à tensão reside nas ligações peptídicas cruzadas, o que torna a inibição dessas ligações cruzadas um alvo atraente para a terapia antibacteriana, além de tudo a parede celular não se encontra em células animais (VON NUSSBAUM et al., 2006).

Em bactérias Gram negativas a parede celular é estrutural e quimicamente mais complexa que em bactérias Gram positivas, como observado na figura 3 (MURRAY, 2010).

**Figura 3** – Constituição estrutural da parede celular de bactérias: a) Gram positivas e b) Gram negativas



Fonte: adaptado de Brown et al., 2015.

Em bactérias Gram positivas, a camada de peptidoglicano corresponde a aproximadamente 90% da parede celular. Também são encontradas proteínas e

ácidos teicóicos que podem representar até 50% da massa seca da parede. Os ácidos teicóicos são polímeros que contribuem para a rigidez da parede celular e são formados por cerca de 30 resíduos de glicerol ou ribitol unidos por ligações fosfodiéster e estão também ligados ao peptidoglicano pelo mesmo tipo de ligação (BARBOZA; TORRES, 2005; RYAN, RAY, 2004).

A parede celular das bactérias Gram negativas apresenta propriedades bioquímicas, fisiológicas e genéticas peculiares. É formada por poucas camadas de peptidoglicano e por uma membrana externa. Entre a membrana citoplasmática e a membrana externa, localiza-se o espaço periplasmático, um compartimento que contém uma alta concentração de enzimas de degradação e proteínas de transporte. O peptidoglicano está ligado à membrana externa da parede através de pequenas lipoproteínas (localizadas no espaço periplasmático). Esta membrana externa é uma estrutura em dupla camada; sua camada interna é composta de fosfolipídios (20%) e proteínas (50%) assemelhando-se à da membrana citoplasmática, possui canais especiais constituído de moléculas proteicas denominadas porinas (proteínas de membrana externa) que permitem a difusão passiva de açúcares, aminoácidos e certos íons; enquanto a camada externa possui em sua composição lipopolissacarídeos (LPS) (30%) (JAWETZ et al., 1998; LEVINSON; JAWETZ, 1998; RYAN; RAY, 2004). Os LPS são uma das principais toxinas responsáveis pelo início de reações fisiopatológicas observadas durante graves infecções e choques sépticos. Essas reações frequentemente observadas são: febre, leucopenia, taquicardia, taquipnéia, hipotensão, coagulação intravascular disseminada e insuficiência de múltiplos órgãos (LAMPING et al, 1998; ULMER et al, 2000).

### **2.1.3 Peptidoglicano**

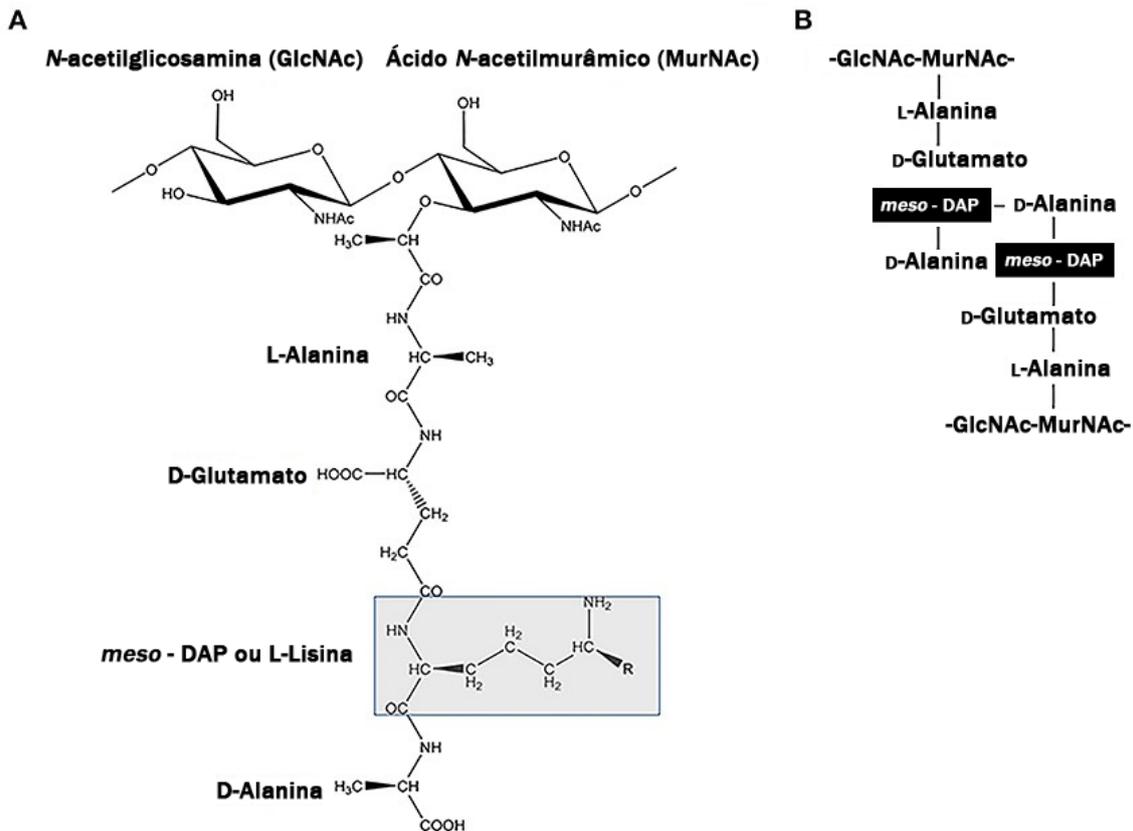
É uma rede macromolecular, também conhecido como mureína. Estruturalmente, o peptidoglicano consiste de cadeias lineares de glicano com unidades alternadas de *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) e ácido *N*-acetilmurâmico (MurNAc), unidas por ligações cruzadas de pontes peptídicas *trans* (KONEMAN et al., 2001; TORTORA et al., 2008; TRABULSI et al., 2008; BASAVANNACHARYA et al., 2010). É responsável por conferir rigidez e forma à parede celular das bactérias, prevenir a lise osmótica e atuar como local de ligação de fatores de virulência (SCHLEIFER; KANDLER, 1972). É essencial para o crescimento e sobrevivência das bactérias, e por ser um componente ausente em células humanas, essas

enzimas que catalisam a biossíntese do peptidoglicano são alvos extremamente atraentes na descoberta de novos antibióticos (LAMICHHANE et al., 2011).

A biossíntese do peptidoglicano é um processo bastante complexo que ocorre em três fases principais, no citoplasma, membrana citoplasmática e espaço periplasmático. A primeira fase ocorre no citosol (líquido que preenche o interior do citoplasma) onde UDP-GlcNAc e UDP-MurNAc-pentapeptídeo são produzidos (VAN HEIJENOORT, 2001). A segunda fase ocorre na membrana citoplasmática, onde as unidades monoméricas dissacarídeo-pentapeptídeo são unidas e polimerizadas (BOUHSS et al., 2008). Estas etapas de produção e polimerização das unidades monoméricas dissacarídeo-pentapeptídeo estão fora do propósito deste estudo.

A terceira e última fase de biossíntese do peptidoglicano, que é extracelular e ocorre no espaço periplasmático, envolve cadeias de unidades monoméricas de peptidoglicano (Figura 4A) e consiste na ligação cruzada destas cadeias entre si por um processo chamado transpeptidação (Figura 4B), que ocorre através de enzimas denominadas transpeptidases, também chamadas de proteínas de ligação da penicilina (PBP), devido ao fato de terem sido identificadas pela primeira vez como as moléculas-alvo de ligação da penicilina.

**Figura 4 –** Formação da estrutura do peptidoglicano; A) unidades monoméricas de peptidoglicano: dissacarídeo de GlcNAc e MurNAc; péptido de L-alanina, D-glutamato, o aminoácido em destaque é o meso-DAP (m-DAP) presente na maioria das bactérias Gram-negativas (ou L-lisina na maioria das bactérias Gram-positivas); B) ligação cruzada de m-DAP com D-alanina de outra unidade monomérica de peptidoglicano



**Fonte:** adaptado de TRIASSI et al., 2014.

As bactérias possuem diversas transpeptidases com especificidades diferentes, mas que se superpõem. Essas isoformas distintas das enzimas são utilizadas para criar diferentes partes da parede. Por exemplo, *Escherichia coli* possui seis transpeptidases, algumas das quais formam a metade cilíndrica dessa bactéria em forma de bastonete, enquanto outras formam suas extremidades hemisféricas.

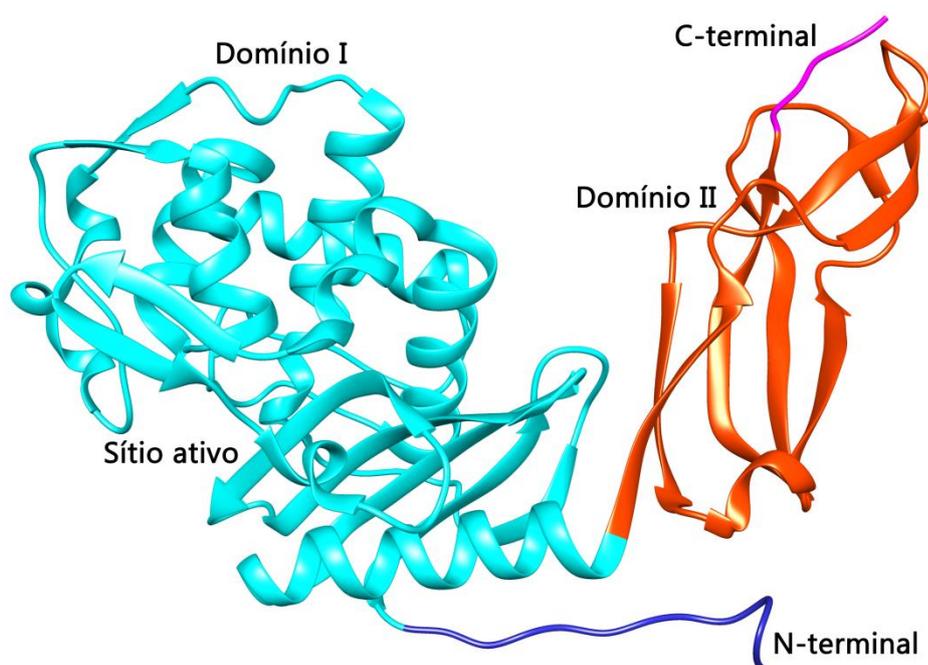
Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos inibem a função enzimática das transpeptidases, impedindo a produção de peptidoglicano e inibindo a síntese da parede celular e o crescimento bacteriano, fazendo com que a célula em crescimento torne-se frágil, o que levará a célula à lise e morte (PARK; UEHARA, 2008).

#### 2.1.4 Proteína de Ligação à Penicilina (PBP)

As Proteínas de Ligação à Penicilina (*Penicillin-Binding Protein*, PBP) são uma família de acil-serina transferases bacterianas que catalisam o passo final de transpeptidação dos monômeros de peptidoglicano. Estão localizadas logo abaixo da parede celular, no espaço periplasmático. A habilidade de penetrar na parede celular e o grau de afinidade destas proteínas com os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos determinam a sua atividade antibacteriana (YAN; GILBERT, 2004). Possuem um sítio ativo de serina e realizam seu ciclo catalítico por uma via de acilação e desacilação.

A PBP majoritária na bactéria em *Escherichia coli* é a Proteína 5 de Ligação à Penicilina (PBP5) (NICHOLAS et al., 2003), na literatura sob o código 3MZE (NICOLA et al., 2010) no Banco de Dados de Proteínas (*Protein Data Bank*, PDB). Sua estrutura cristalografada com 352 aminoácidos, numerados de 4 a 355, é formada por dois domínios. O domínio I, do aminoácido 16 a 262, conhecido como domínio PB (*Penicillin-Binding*), onde está localizado o sítio ativo e ocorrem as interações com os antimicrobianos e o domínio II, do resíduo 264 a 349 predominantemente de folhas- $\beta$ , que tem característica espacial bastante flexível, devido às alças e folhas- $\beta$  que compõem este domínio (Figura 5). Além do N-terminal e C-terminal que compõem sua estrutura.

**Figura 5** – Estrutura tridimensional a proteína 3MZE

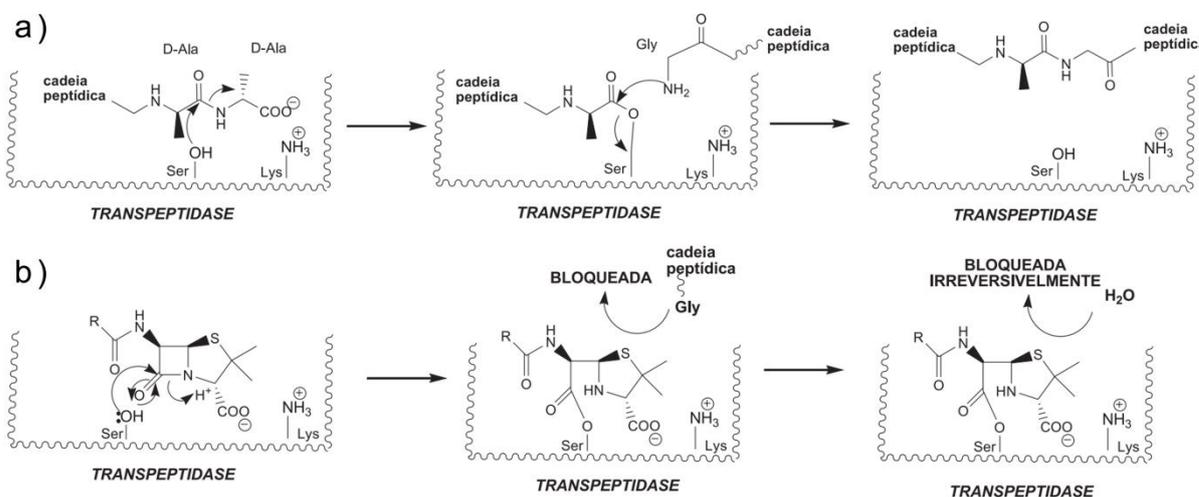


**Fonte:** dados extraídos desta pesquisa.

A proteína desloca-se para a parede celular para promover a ligação cruzada entre os peptídeos (DEN BLAAUWEN et al. 2008; POTLURI et al., 2010), onde o átomo de oxigênio O do resíduo de serina desloca o resíduo D-Ala terminal de uma cadeia peptídica para formar um intermediário proteína-peptidoglicano, o grupo amino livre no aminoácido terminal m-DAP do peptídeo ataca esse intermediário, resultando na formação da ligação cruzada (Figura 6a).

São inibidas pela ligação covalente à antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em seu sítio ativo, onde o átomo de oxigênio O do resíduo de serina (Ser44) localizada no sítio ativo de ligação da PBP5 liga-se de modo covalente ao anel  $\beta$ -lactâmico através do átomo de carbono carbonílico, quebrando a ligação entre ele e o átomo de N, rompendo o anel (Figura 6b), em uma reação irreversível. Em consequência à inativação da transpeptidase, o polímero linear não é transformado em polímero cruzado e não se forma a parede celular bacteriana (LIVERMORE; WILLIAMS, 1996). (SAUVAGE et al., 2008; ZAPUN et al., 2008).

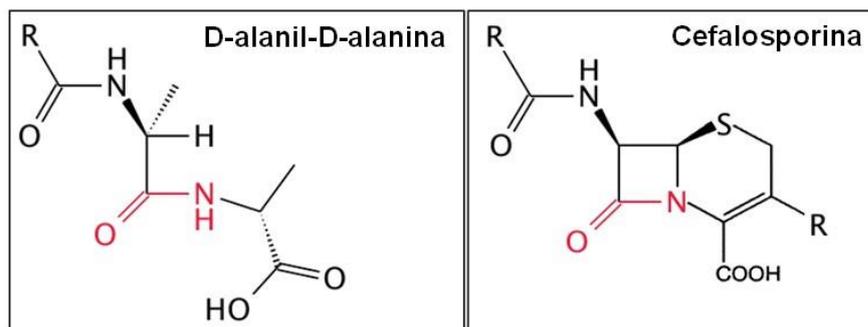
**Figura 6** – (a) mecanismo catalisado pela transpeptidase para a formação cruzada entre cadeias peptídicas da parede celular bacteriana; (b) inibição irreversível da transpeptidase por antibióticos  $\beta$ -lactâmicos



Fonte: GUIMARÃES et al., 2010.

Quimicamente, os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos ligam-se às PBPs em razão do anel  $\beta$ -lactâmico ser um análogo estrutural do grupo terminal dipeptídico D-alanil-D-alanina das unidades de peptidoglicano da parede celular bacteriana (Figura 7).

**Figura 7** – Semelhança estrutural entre D-alanil-D-alanina e Cefalosporina



**Fonte:** dados extraídos desta pesquisa.

A inibição da transpeptidase em células no processo de desenvolvimento resulta em autólise e morte celular. Por conta disso, os  $\beta$ -lactâmicos são utilizados como antibióticos para as bactérias em divisão ativa.

### 2.1.5 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é um bacilo Gram negativo, anaeróbico, que constitui um grupo heterogêneo de bactérias tipicamente não patogênicas que habitam naturalmente a microbiota intestinal dos seres humanos e animais, onde são extremamente prolíficos. Entretanto, certas linhagens de *E. coli* podem ser patogênicas, apresentando fatores de virulência que as tornam capazes de causar doenças intestinais e extraintestinais, como infecções no trato geniturinário, meningites e septicemias (KAPER, 2004). Ela descoberta no cólon humano em 1885 pelo bacteriologista alemão Theodor Escherich (FENG; WEAGANT; GRANT, 2002), que mostrou que certas estirpes da bactéria foram responsáveis por diarreia infantil e gastroenterite, uma descoberta importante para a saúde pública. É importante lembrar que algumas bactérias *E. coli* são benéficas, enquanto outras causam algumas infecções (EISENSTEIN; ZALEZNIK, 2000; FENG; WEAGANT; GRANT, 2002), geralmente quando conseguem alcançar outros órgãos do nosso corpo e nesses casos, podem causar infecções, do tipo intestinal: apresentando diarreia com ou sem sangue e dor ao evacuar; e no trato urinário: provocando dor ou ardor ao urinar e dor durante relações íntimas. A maioria das infecções urinárias são causadas por *E. coli*, que devido à proximidade da uretra feminina com o ânus frequentemente consegue passar do trato digestivo para o trato urinário. A profilaxia deve ser realizada a partir da boa higiene dos alimentos consumidos e também

através das boas condições de saneamento básico, não permitindo que a água ou os alimentos sejam contaminados por rejeitos humanos ou de outros animais.

A infecção por *E. coli* pode ocorrer quando estas bactérias se multiplicam no intestino e chegam ao trato urinário, ou através do consumo de água ou de alimentos contaminados, pois a bactéria pode ser excretada pelas fezes que, por sua vez, tendem a contaminar águas de superfícies ou subterrâneas, bem como culturas de hortifrutigranjeiros, o solo e produtos de origem animal, como os produtos lácteos (queijos e leite cru). Além disso a *E. coli* também pode ser transmitida pelo contato direto com animais infectados e pessoa a pessoa, por meio da transmissão fecal-oral e contaminação cruzada no preparo de alimentos (RIVAS, 2008).

Todas as linhagens patogênicas possuem fímbrias especializadas capazes de aderir à mucosa intestinal. As bactérias destroem as microvilosidades e induzem a formação de projeções semelhantes a pedestais, onde se alojam. Elas também produzem toxinas que causam distúrbios gastrintestinais, denominados coletivamente gastroenterite por *E. coli*. Algumas dessas linha são: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC, de *enterotoxigenio E. coli*) é não invasiva, mas produz uma enterotoxina que causa uma diarreia aquosa que lembra um caso leve de cólera; *E. coli* enteroagregativa (EAEC, de *enteroaggregative E. coli*), denominadas assim por conta de sua forma de crescimento na qual as bactérias aderem-se umas às outras em uma configuração de “tijolos empilhados”; *E. coli* enteroinvasiva (EIEC, de *enteroinvasive E. coli*) invade a parede intestinal resultando em inflamação, febre e, algumas vezes, uma disenteria parecida com a causada por bactérias gram-negativas do gênero *Shigella*. As *E. coli* entero-hemorrágicas têm como principal fator de virulência a produção da toxina Shiga, e já causaram vários surtos de doenças graves, algumas vezes elas são denominadas toxina Shiga de *E. coli* (STEC, de *Shiga-toxin E. coli*).

Essa toxina é surpreendentemente virulenta e frequentemente resulta em disenteria grave e prostração. Em cerca de 6% das pessoas infectadas, a toxina Shiga produz uma inflamação do colo (o intestino grosso acima do reto) com sangramento profuso, chamada de colite hemorrágica. Estas *E. coli* não invadem a parede intestinal, mas liberam a toxina no lúmen intestinal (espaço interno do intestino). Outra complicação perigosa é a síndrome hemolítico-urêmica (HUS, de *Hemolytic Uremic Syndrome*) caracterizada por sangue na urina, frequentemente

levando à insuficiência renal; a HUS ocorre quando os rins são afetados pela toxina. Cerca de 5 a 10% das crianças pequenas que foram infectadas progridem para esse estágio, que tem uma taxa de mortalidade de cerca de 5%. Entre os sobreviventes da HUS, alguns podem necessitar de diálise renal ou mesmo de transplantes. Estima-se que 200 a 500 óbitos ocorram anualmente.

Em 2011, doze países sofreram um surto de infecções causadas por *E. coli* que contaminou aproximadamente 3.836 pessoas na Europa e provocou 45 mortes, cerca de 3.200 casos e 35 mortes só no Norte da Alemanha. O Instituto Robert Koch, de Berlim, após intensas pesquisas comprovou que o surto da bactéria teve origem em vegetais produzidos de uma exploração agrícola de Bienenbuettel, na Baixa Saxônia. Em junho deste ano, dois brasileiros, após voltarem de uma viagem à Europa, apresentaram os primeiros sintomas e foram os dois primeiros casos com suspeita de contaminação.

O tratamento das infecções causadas por esta bactéria é realizado a partir da utilização de antibióticos capazes de agir no combate a esta bactéria, tais como antibióticos da classe de cefalosporinas.

## **2.2 Antibióticos**

O pesquisador Paul Ehrlich, conhecido como o pai da quimioterapia, foi o responsável pelos conceitos primários de que uma substância química poderia interferir na proliferação de microrganismos (PATRICK,1995). O grande marco no tratamento das infecções bacterianas ocorreu com a descoberta da penicilina, por Alexander Fleming, em 1928 (NICULAOU; MONTAGNON, 2008).

Os antibióticos são compostos naturais ou sintéticos que inibem o crescimento ou causam a morte de fungos e bactérias (WALSH, 2003). A maioria dos antibióticos em uso clínico é de origem natural e seus derivados semissintéticos, e podem ser classificados como  $\beta$ -lactâmicos, caracterizados quimicamente pela presença do grupamento de amida cíclica com fechamento na posição  $\beta$ , conhecido como anel  $\beta$ -lactâmico ou azetidiona, tais como: penicilinas, cefalosporinas, carbapeninas, oxapeninas e monobactamas. Também são classificados os antibióticos tetraciclina, aminoglicosídeos, macrolídeos, peptídicos cíclicos (glicopeptídicos, lipodepsipeptídeos), estrptograminas, entre outros (lincosamidas, cloranfenicol, rifamicinas, etc) (PATRICK, 1995, 2005; PUPO, 2006; ABRAHAM, 2003). As subclasses de agentes  $\beta$ -lactâmicos diferem entre si estruturalmente nos

substituintes químicos (radicais) que estão fixados ao anel  $\beta$ -lactâmico. Em geral, são resultantes dos esforços químicos e farmacológicos em melhorar o espectro de ação dos antibióticos e permanecendo à frente da questão da resistência bacteriana a antibióticos. O espectro de ação refere-se ao número e à variedade de espécies de bactérias contra as quais determinado antibiótico possui atividade bactericida ou bacteriostática. Em geral, os  $\beta$ -lactâmicos de amplo espectro são tipicamente ativos contra bactérias Gram negativas e Gram positivas.

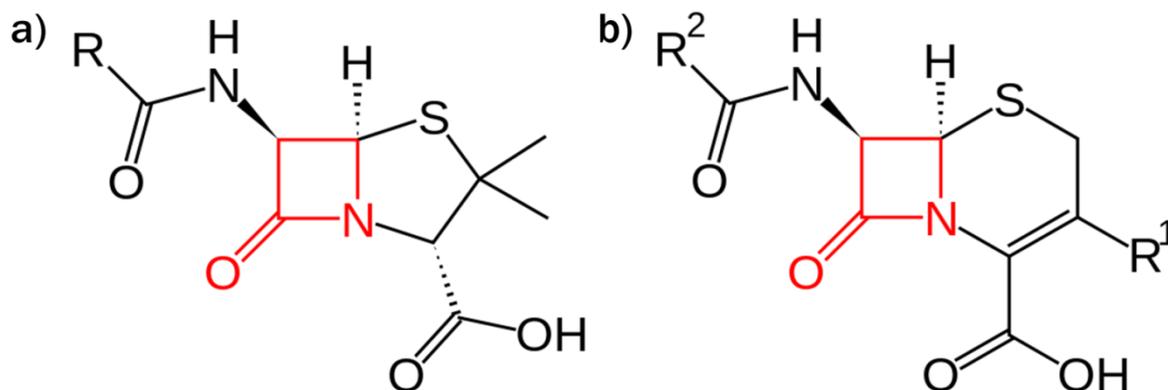
Segundo Fraimow e Tsigrelis, “a resistência é a medida da habilidade reduzida que um agente antimicrobiano tem em matar ou inibir o crescimento de um organismo microbiano” (FRAIMOW; TSIGRELIS, 2011). A resistência bacteriana reduz as possibilidades de tratamento das infecções, limitando a atuação médica e ameaçando o efeito do medicamento (MARTINE, 2009). Nas últimas décadas, em resposta ao constante e inadequado uso de antibióticos e sua presença no meio ambiente, as bactérias têm apresentado forte resistência a estes compostos. Tornando estes fármacos quase ineficientes (LEVY, 2001; DEMAIN, 2002; WOODFORD, 2005). As bactérias multiplicam-se rapidamente, sofrem mutações e podem até trocar informações genéticas entre microrganismos de mesma espécie ou de espécies diferentes, transferindo os genes de resistência para novos hospedeiros (FERNANDES, 2006; VON NUSSBAUM, 2006). A resistência adquirida corresponde a uma mudança no fenótipo usual de um determinado microrganismo resultando em diminuição da efetividade de um antimicrobiano ativo na população selvagem (sem mutações) desta espécie, portanto, esta resistência é uma consequência natural de microrganismos geneticamente adaptados respondendo à pressão seletiva que os agentes antimicrobianos exercem sobre eles (FRAIMOW; TSIGRELIS, 2011).

Os agentes antimicrobianos podem influenciar sobre a parede celular e/ou sobre a membrana celular bacteriana, e ainda sobre atividades enzimáticas, bloqueando certas reações enzimáticas ou processos biossintéticos na célula bacteriana, podendo levar a destruição desses microrganismos (RANG et al., 1997; TRABULSI et al., 1999). Os antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos atuam bloqueando a terceira etapa do processo de biossíntese do peptidoglicano, impedindo a maturação deste polímero principalmente através do bloqueio do mecanismo de transpeptidação.

A maior e mais amplamente utilizada classe de inibidores da síntese da parede celular bacteriana são os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, que inibem irreversivelmente a enzima transpeptidase, que catalisa a reação de formação de ligações cruzadas entre as cadeias peptídicas da estrutura do peptidoglicano da parede celular bacteriana (VON NUSSBAUM et al., 2006; WALSH, 2003; SUARÉZ, 2009). Constituem a primeira classe de derivados de produtos naturais utilizados no tratamento terapêutico de infecções bacterianas. Várias décadas após a descoberta da penicilina, este grupo ainda contém os agentes mais comumente utilizados. Possuem amplo espectro de atividade antibacteriana, eficácia clínica e excelente perfil de segurança, uma vez que as vias metabólicas e enzimáticas da transpeptidase são única e exclusivamente encontradas em bactérias.

O maior número de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em uso clínico pertence à classe das cefalosporinas, que estão subdivididas em cefalosporinas de primeira, segunda, terceira e quarta gerações, em função de seu espectro de ação frente à bactérias Gram positivas e Gram negativas (PATRICK, 2005, 1995; SUARÉZ, 2009). O sistema bicíclico tensionado dos antibióticos da classe de penicilinas e cefalosporinas contribui para o aumento da instabilidade química do anel  $\beta$ -lactâmico, que se torna altamente suscetível ao ataque de nucleófilos que promovem a hidrólise do grupo farmacofórico. O sistema bicíclico das cefalosporinas é menos tensionado em comparação ao das penicilinas, contribuindo para a maior estabilidade frente à reação de abertura intramolecular do anel  $\beta$ -lactâmico pela cadeia lateral (PATRICK, 2005, 1995; SUARÉZ, 2009). Todos os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos têm um elemento estrutural farmacofórico em comum, o anel  $\beta$ -lactâmico de quatro membros, em destaque na cor vermelha na figura 8. As cefalosporinas apresentam um anel de seis membros (di-hidrotiazínico) fundido ao anel central  $\beta$ -lactâmico (Figura 8a) e as penicilinas possuem um anel de cinco membros (tiazolidínico) (Figura 8b) (VON NUSSBAUM, 2006; SUARÉZ, 2009).

**Figura 8** – (a) estrutura das penicilinas; (b) estrutura das cefalosporinas

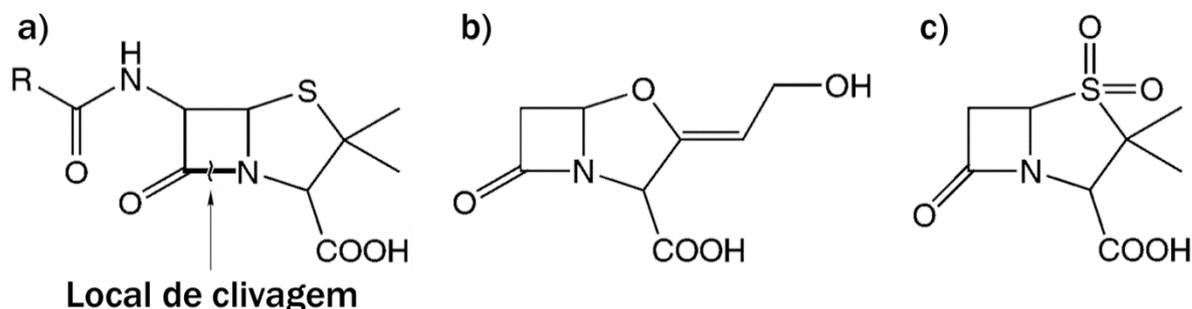


**Fonte:** adaptado de GUIMARÃES et al., 2010.

As modificações estruturais possíveis ficam restritas às cadeias laterais, que influenciam na estabilidade em meio ácido (fundamental para a atividade por via oral destes fármacos), na estabilidade frente às  $\beta$ -lactamases e no espectro de ação frente a bactérias Gram negativas.

As  $\beta$ -lactamases compõem um grupo heterogêneo de enzimas bacterianas (DIENSTMANN et al., 2010). O principal mecanismo de resistência bacteriana aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos está associado à produção das  $\beta$ -lactamases que apresentam grupos nucleofílicos (em geral, resíduos de serina) capazes de hidrolisar o anel  $\beta$ -lactâmico, inativando o antibiótico. Portanto, a modificação molecular responsável pelo aumento da resistência dos antibióticos às  $\beta$ -lactamases é a introdução de grupos volumosos nas cadeias laterais dos compostos, impedindo seu acesso ao sítio ativo das  $\beta$ -lactamases por impedimento estereoquímico (SUARÉZ, 2009). A figura 9a apresenta, de modo simples, um composto  $\beta$ -lactâmico e a ação da enzima  $\beta$ -lactamase clivando/ (quebrando) a ligação do anel  $\beta$ -lactâmico, figuras 9b e 9c permitem observar a semelhança estrutural entre os inibidores das  $\beta$ -lactamases e os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. Tais aspectos estruturais permitem aos inibidores das  $\beta$ -lactamases ligarem-se irreversivelmente à elas como substratos suicidas, mantendo-as inativas. O ácido clavulânico e o sulbactam são dois dos inibidores de  $\beta$ -lactamases mais frequentemente usados na clínica médica atualmente (WILLIAMS, 1999).

**Figura 9** – (a) clivagem da ligação do anel  $\beta$ -lactâmico por uma  $\beta$ -lactamase; (b) ácido clavulânico e (c) sulbactam



**Fonte:** dados extraídos desta pesquisa.

Devido à natureza mais complexa da parede celular das bactérias Gram negativas, estas são mais resistentes à ação de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, pois as transpeptidases bacterianas estão localizadas no espaço periplasmático e os antibióticos precisam atravessar a parede celular complexa para exercer seus efeitos. Para ter acesso à célula bacteriana, os antibióticos devem cruzar a parede celular através de canais proteicos de porina, embebidos na estrutura lipídica, que apresentam o interior com características hidrofílicas. Assim, os antibióticos com maior atividade frente a bactérias Gram negativas são aqueles que apresentam elevado grau de penetração da membrana externa e na parede celular a partir dos grupos ionizáveis com suas estruturas químicas (GUIMARÃES et al., 2010).

### 2.2.1 Cefalosporinas

As cefalosporinas diferem estruturalmente das penicilinas pela presença de um anel acessório de seis membros, e não de cinco membros, fixado ao anel  $\beta$ -lactâmico. Elas são classificadas como antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e podem ser de origem natural (fungo *Cephalosporium*) ou de origem semissintética (BARCENILLA et al., 2001; SCHINDLER, 2007).

Existem 4 principais gerações de cefalosporinas, que diferem em sua ação frente às bactérias Gram negativas e Gram positivas: 1ª geração agem fortemente contra Gram positivos e algumas Gram negativas como *E. coli*, *Proteus mirabilis* e *K. pneumoniae*; 2ª geração agem fortemente contra Gram negativas; 3ª geração agem fortemente contra Gram negativas e moderadamente contra Gram positivas; 4ª geração agem fortemente contra Gram positivas e moderada contra Gram negativas (GUIMARÃES et al, 2010).

As cefalosporinas geralmente podem ser utilizadas em pacientes com alergia não-potencialmente fatal às penicilinas. Mas podem causar reações de hipersensibilidade e, por conseguinte, devem ser evitadas em pacientes com hipersensibilidade reconhecida a esses fármacos. Os efeitos adversos desses fármacos incluem diarreia, ligeira elevação das enzimas hepáticas e reações de hipersensibilidade, raramente podem ocorrer agranulocitose ou nefrite intersticial.

### 2.2.2 Escolha dos ligantes

Os ligantes cefoxitina, cefuroxima, cefotaxima, cefalotina, cefixima, cefmetazole e ácido 7-aminocefalosporânico (7-ACA) foram selecionados com base no estudo experimental de Majorek et al., em 2013, que estuda a atividade destes e outros compostos na inibição da proteína PA4794 (uma acetiltransferase membro da superfamília de GNAT's) encontrada na bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, um patógeno oportunista que explora eventuais fraquezas do organismo para estabelecer um quadro de infecção. Foram encontrados nos ligantes  $\beta$ -lactâmicos cefalosporínicos uma densidade de elétrons bem ordenados na região do anel. Estes ligantes foram capazes de inibir a função enzimática da PA4794, que, embora pouco se conheça sobre elas, sabe-se que estas proteínas têm função de acetilação, o que pode desempenhar papel regulador importante na bactéria (ALAGOZLU et al., 2006; HOOPER, 2005; BOMONO e SZABO, 2006). Os experimentos de Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC) quantificaram a afinidade das interações dos ligantes com o sítio ativo da proteína, na seguinte ordem, cefotaxima > cefalotina > cefoxitina > cefuroxima.

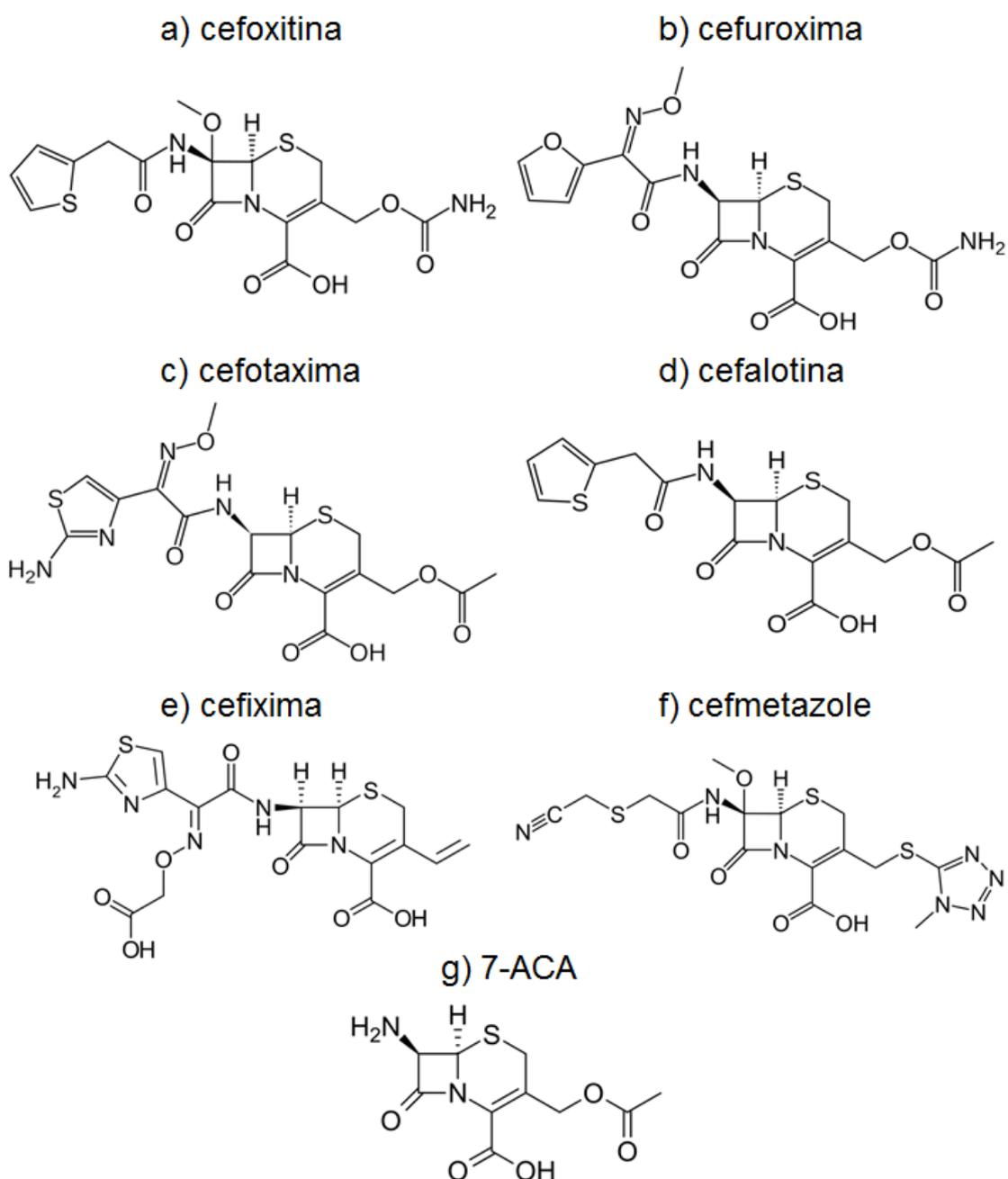
A seleção destes ligantes se dá com base em sua semelhança estrutural com o ligante complexado com a proteína 3MZE (NICOLA et al., 2010), pois pertencem a mesma classe de cefalosporinas.

### 2.2.3 Ligantes

A cefoxitina (Figura 10a), a cefuroxima (Figura 10b) e cefmetazole (Figura 10f) são compostos cefalosporínicos de segunda geração, resistentes à muitas  $\beta$ -lactamases. Possuem atividade aumentada contra *Bacteroides* e *Haemophilus influenzae*, respectivamente. A cefotaxima (Figura 10c) é um composto cefalosporínico de terceira geração resistente à muitas  $\beta$ -lactamases e são altamente ativas contra Enterobacteriaceae (*Proteus* indol-positivo, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Citrobacter*) e contra *Neisseria* e *H. influenzae*. É utilizada

predominantemente no tratamento de infecções bacterianas Gram negativas hospitalares e infecções documentadas por *P. aeruginosa*. A cefalotina (Figura 10d) é uma cefalosporina de primeira geração, amplamente utilizada contra germes Gram-positivos (exceto enterococos) e Gram-negativos. A cefixima (Figura 10e) é uma cefalosporina de terceira geração, com amplo espectro contra Gram-negativas. O ácido 7-aminocefalosporânico (7-ACA) (Figura 10g) foi obtido inicialmente de um antibiótico natural, a cefalosporina C.

**Figura 10** – Estruturas dos cefalosporínicos: (a) cefoxitina; (b) cefuroxima; (c) cefotaxima; (d) cefalotina; (e) cefixima; (f) cefmetazole; (g) 7-ACA



**Fonte:** dados extraídos desta pesquisa.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Realizar estudo teórico das interações entre antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos da classe de Cefalosporinas e a Proteína 5 de Ligação à Penicilina (PBP5) de *Escherichia coli* (3MZE) envolvida na fase final da síntese do peptidoglicano da parede celular bacteriana.

#### **3.2 Objetivos específicos**

a) Estudar o comportamento molecular dos compostos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos no sítio ativo da PBP5 de *E. coli* por meio de simulações de Dinâmica Molecular;

b) Verificar teoricamente as interações intermoleculares específicas entre os compostos  $\beta$ -lactâmicos e os aminoácidos da enzima 3MZE por meio de cálculos de energia de interação por resíduos;

c) Analisar a espontaneidade energética dos sistemas em estudo por meio de cálculos de energia livre de ligação;

d) Identificar o inibidor cefalosporínico mais estável para a inibição da ação enzimática da PBP5;

e) Contribuir para a construção estrutural de novos inibidores.

## 4 MÉTODOS COMPUTACIONAIS

Este trabalho tem início na escolha da Proteína 5 de Ligação à Penicilina (PBP5), majoritária na bactéria *Escherichia coli* e na seleção dos ligantes. A PBP5 foi encontrada no Banco de Dados de Proteínas (*Protein Data Bank*, PDB) sob o código 3MZE (NICOLA et al., 2010), complexada covalentemente ao inibidor cristalográfico cefoxitina. A estrutura cristalografica da enzima 3MZE apresenta 352 resíduos de aminoácidos detectados cristalograficamente, numerados de 4 a 355, que constituem apenas uma cadeia proteica, formada por dois domínios. O domínio I, do aminoácido 16 a 262, conhecido como domínio PB (*Penicillin-Binding*) ou domínio I, e o domínio II, do resíduo 264 a 349. Além do N-terminal e C-terminal que compõem sua estrutura, de acordo com a figura 5 apresentada anteriormente.

A estrutura do inibidor estava ligado ao resíduo Ser44 da proteína por ligação covalente à distância de 1,37 Å, e essa ligação foi rompida e o ligante foi ligeiramente afastado do resíduo com o auxílio do programa VMD (*Visual Molecular Dynamics*) (HUMPHREY, 1996), deixando à distância de 2,31 Å entre os átomos que estavam ligados, átomo de OG do resíduo de serina e o átomo de C da carbonila do anel  $\beta$ -lactâmico, e foi salvo sua estrutura isolada do ligante. Em seguida, por meio do programa GaussView, foi reestruturada a ligação entre o átomo de carbono da carbonila e o átomo de nitrogênio, fechando novamente a estrutura do anel  $\beta$ -lactâmico do ligante. Finalmente, foi realizado o cálculo de otimização parcial da cefoxitina, pelo método B3LYP e conjunto de base 6-31G com duas funções polarizadas (\*\*), utilizando o programa Gaussian 03 (FRISCH et al., 2004), obtendo uma estrutura energeticamente estável. A otimização molecular objetiva encontrar uma conformação com o mínimo de conteúdo energético e estruturalmente bastante estável, corrigindo os erros das distâncias, ângulos e torções entre os átomos da estrutura, garantindo a estabilidade do composto otimizado.

A estrutura da proteína 3MZE foi submetida ao cálculo de pKa pelo servidor online PDB2PQR (DOLINSKY et al., 2004), uma ferramenta que executa a preparação de estruturas proteicas acrescentando átomos hidrogênios aos aminoácidos, atribuindo cargas atômicas e raio de campos de força especificados a cada átomo da cadeia proteica.

Os compostos utilizados foram selecionados da literatura, com base nos estudos experimentais realizados por Majorek et al. em 2013. Os antibióticos

cefalosporínicos selecionados foram a cefuroxima, cefotaxima, cefalotina, cefixima, cefmetazole e o ácido-7-aminocefalosporânico (7-ACA), de acordo com as semelhanças estruturais ao composto cristalográfico da PBP5 de *E. coli* e com os resultados obtidos pelo estudo experimental.

Os inibidores foram construídos tridimensionalmente a partir da estrutura otimizada da cefoxitina (cristal), utilizando o programa Avogadro 1.1.0 (HANWELL, 2012), a fim de manter a conformação estrutural do núcleo cefalosporínico idêntico para todas as estruturas, e então, otimizados parcialmente pelo método B3LYP e conjunto de base 6-31G\*\* com o auxílio do programa Gaussian 03.

Em seguida, todos os sete ligantes foram submetidos à cálculo de carga pelo método de potencial eletrostático restringido (RESP, do inglês *Restrained Electrostatic Potentials*), utilizando o programa Gaussian 03 com o método Hartree-Fock e o conjunto de base 6-31G\*. O método RESP foi o esquema de cálculo de carga escolhido devido sua acurácia para determinar as cargas atômicas, em detrimento de métodos menos sofisticados onde observava-se uma variância rotacional das cargas atômicas e obtinha-se valores de cargas excessivamente altos e com alta dependência conformacional, esse problema foi minimizado através da adição de restrições nos valores de carga para átomos de não hidrogênio durante o procedimento de ajuste e é capaz de reproduzir o potencial eletrostático molecular em uma série de pontos em torno da molécula (BAYLY et. al., 1993).

Os compostos com estruturas otimizadas foram inseridos no sítio ativo de ligação da PBP5 através da técnica de alinhamento de estruturas, possível por meio do programa Pymol (DeLano, 2002), visto que os ligantes foram construídos com base na estrutura espacial do ligante cristalográfico, as estruturas foram alinhadas na sua localização espacial no sítio ativo. Cada estrutura foi salva em arquivos individuais com as novas coordenadas cartesianas.

Os sistemas foram preparados utilizando os programas Antechamber e tLEaP, implementados no programa AMBER12 (Construção Assistida de Modelos com Refinamento de Energia, do inglês *Assisted Model Building with Energy Refinement*) (CASE et al., 2012), que é um conjunto de programas que permitem aos usuários a realização as simulações de DM, particularmente em biomoléculas.

Primeiramente os sete ligantes foram submetidos à parametrização pelo Antechamber, extraíndo as propriedades de carga RESP, coordenadas da estrutura do ligante e os parâmetros de ligações, ângulos, diedros, entre outros.

Posteriormente, os complexos ligante-proteína foram preparados pelo tLEaP como arquivos de entrada para as simulações no AMBER12, utilizando o Campo de Força Geral do AMBER (GAFF, do inglês *General Amber Force Field*) (WANG, 2004), aplicado para os ligantes pois fornece parâmetros para praticamente todas as pequenas moléculas orgânicas para facilitar as simulações de fármacos, e o campo de força ff99SB (HORNAK, 2006), aplicado para a estrutura da proteína pois foi desenvolvido para melhorar o equilíbrio de sua estrutura secundária. Ainda no tLEaP, os ligantes foram combinados com a estrutura da proteína, formando os sete complexos. Esses complexos foram então solvatados em uma caixa de água (BERENDSEN, 1981) de formato octaédrico modelo TIP3P (JORGENSEN, 1983), com raio de 12,0 Å entre as extremidades da caixa e a superfície da proteína, em seguida foi adicionado um íon Na<sup>+</sup> a cada sistema com o objetivo de neutralizar sua carga negativa por completo.

Após a preparação dos sete sistemas formados pelos compostos cefoxitina, cefuroxima, cefotaxima, cefalotina, cefixima, cefmetazole e 7-ACA inseridos no sítio ativo da transpeptidase PBP5 de *E. coli*, iniciou-se a preparação para as simulações de Dinâmica Molecular (DM) com o método de Mecânica Molecular (MM), que foram realizados no programa AMBER12 (CASE et al., 2012).

No primeiro passo antes de iniciar as simulações de DM, cada sistema foi minimizado aplicando restrições harmônicas com uma constante de força de 500 Kcal/(mol·Å) para todos os átomos do soluto (proteína e ligante) sendo minimizados por 10000 ciclos e em mais três passos de minimização foram aplicados com restrições de 100, 20 e 10 Kcal/(mol·Å) incluindo soluto e solvente. Posteriormente, iniciou-se a dinâmica molecular aquecendo todo o sistema à temperatura padrão de 300K, com duração de 50 picosegundos (ps) com restrições de posição em volume constante aplicando o algoritmo Shake (RYCKAERT, 1977), e em seguida equilibrados para ajustar o solvente com uma pressão de 1 atm por mais 1000 ps. Por fim, a produção de DM foi realizada, executando 50 nanosegundos (ns) de simulação para cada sistema.

Dinâmica Molecular é a designação dada à simulação computacional do movimento das partículas, que formam um sistema de interesse. Segundo a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), a “dinâmica molecular é um procedimento de simulação que consiste na computação do movimento dos átomos em uma molécula ou de átomos individuais ou moléculas em sólidos, líquidos e

gases, de acordo com as leis de movimento de Newton”. Em outras palavras, descreve a variação do comportamento molecular em função do tempo (VERLI, 2014).

O “comportamento molecular” se refere a quaisquer propriedades de uma molécula em estudo, tais como seu conteúdo de estrutura secundária, orientação de cadeias laterais, conformação de alças e a energia de interação entre diferentes moléculas (enzima-substrato, proteína-proteína, proteína-DNA ou fármaco-receptor). Por outro lado, a ideia de que estas propriedades variam em função do tempo indica que as mesmas não são estáticas, mas se modificam em soluções biológicas. Isto aproxima em muito a DM de métodos experimentais, que geram medidas representando, de fato, médias temporais, colhidas durante a realização do experimento. Assim, ao final de uma simulação de DM, buscamos estas propriedades médias, representativas de comportamentos biológicos medidos experimentalmente (NAMBA, SILVA, SILVA, 2008; VERLI, 2014).

Métodos de DM utilizam o formalismo clássico (mecânica de Newton), ou seja, as partículas são unidas por forças harmônicas e elásticas (ADCOCK, 2006). Para a realização dos cálculos de trajetórias de tempo é implementado um conjunto de potenciais de interações entre as partículas que é conhecido como campo de força (DURRANT, 2011). O campo de força é uma função de energia potencial que permite calcular a energia potencial total do sistema ( $V(r)$ ) em relação ao tempo a partir da estrutura tridimensional (ACKERMANN, 1990).

Sendo assim, com a utilização do campo de força é possível calcular a energia potencial total do sistema,  $V(r)$  a partir da estrutura tridimensional do sistema. A energia potencial  $V(r)$  é descrita como a soma de vários termos de energia, como: átomos ligados (comprimentos e ângulos de ligação, ângulos diedros) e átomos não ligados exercendo interações de Van der Waals e de Coulomb (ACKERMANN, 1990). Um exemplo de campo de força pode ser visto na equação 1.

$$E_{Total} = \sum \frac{1}{2} kl (l - l_o)^2 + \sum \frac{1}{2} k\theta (\theta - \theta_o)^2 + \sum \frac{1}{2} K_\varphi (1 - \cos(n_\varphi - \varphi_o))^2 + \sum 4\epsilon \left( \frac{A}{r_{ij}^{12}} - \left( \frac{B}{r_{ij}^6} \right) \right) + \sum 4\epsilon \left( \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_o r_{ij}} \right) \quad (1)$$

A equação 1, ilustra o campo de força sendo utilizado para o cálculo de energia total de um sistema, sendo que a equação é dividida em cinco termos

energéticos: potencial de estiramento; potencial de torção angular; torção do ângulo diedro; potencial de Lennard-Jones e Potencial de Coulomb (DURRANT, 2011).

A técnica de solvatação na dinâmica molecular é essencial, uma caixa d'água contorna o sistema proteico, adicionando volume e condições de meio para a simulação, essa estratégia é denominada condições periódicas de contorno. Somente a caixa central é simulada na DM, enquanto que as réplicas garantem a continuidade do sistema, isto é, ausência de contato das moléculas com o vácuo. Estas formas permitem que uma caixa de simulação seja replicada em todas as suas dimensões, de forma periódica. Estas réplicas são idênticas à caixa construída, de forma que um movimento molecular em uma será idêntico ao movimento da mesma molécula na outra. E, caso uma molécula saia da caixa central, uma de suas imagens entrará pela face oposta, mantendo o número de moléculas constante. Isto representa uma continuidade da solução, nos aproximando de condições experimentais (VERLI, 2014).

Antes da simulação da dinâmica molecular é necessário realizar a minimização do modelo como forma de eliminar conflitos estereoquímicos e distorções entre ângulos e comprimentos de ligação entre os átomos (ADCOCK; McCOMMON, 2006). A minimização corresponde à otimização da geometria das moléculas e consiste em alterar as coordenadas cartesianas dos átomos de forma a encontrar o mínimo de energia potencial global, isto é, alterá-los para valores próximos ou iguais as suas posições de equilíbrio. A cada simulação de minimização, a energia do sistema diminui, com a redução de contatos desfavoráveis e a formação de interações intra e intermoleculares como ligações de hidrogênio (NAMBA, SILVA, SILVA, 2008; ADCOCK; McCOMMON, 2006).

No estudo de DM é comum a necessidade de encontrar o equilíbrio do sistema, devido ao uso de estruturas 3D derivadas de ambientes cristalinos, isto é, aquelas obtidas por cristalografia de raios-X. A ideia de equilibrar o sistema em uma simulação por DM se refere à estabilização de suas propriedades, ou seja, que estas alcancem um estado de equilíbrio. Considera-se que, antes de estarem equilibradas, as propriedades em estudo apresentam variações ou comportamentos não representativos das situações de interesse. Assim, é necessário que o tempo de simulação seja suficientemente longo para que as propriedades em estudo estejam adequadamente equilibradas (NAMBA, SILVA, SILVA, 2008; VERLI, 2014).

As análises de simulações por DM devem, preferencialmente, ser realizadas observando propriedades de complexidade crescente (o que costuma estar associado ao tempo requerido à equilibração desta propriedade). Assim, as primeiras propriedades a serem avaliadas são normalmente a pressão, o volume, a densidade e a energia total do sistema. Todas estas propriedades devem alcançar um patamar estável, paralelo ao eixo x (tempo) (VERLI, 2014).

Pode-se observar alguma variação no início da simulação, mas, em seguida, devem atingir este patamar e se manter neste nível ao longo da simulação. Embora seja uma rotina, mesmo obrigatória, na grande maioria dos métodos experimentais empregados no estudo de sistemas biológicos, o uso de métodos estatísticos não é, ainda, comum na análise de resultados obtidos em simulações por DM. Isto se deve ao fato de que, em uma mesma simulação, são normalmente gerados centenas de milhares ou mesmo milhões de dados para uma mesma variável (tamanho da simulação dividido pelo tempo de integração). O grande número de variáveis obtidas tenderá a tornar estatisticamente significativa mesmo variações bem pequenas nas propriedades de interesse (NAMBA, SILVA, SILVA, 2008; VERLI, 2014).

Após a realização da DM é necessário verificar a estabilidade dos sistemas simulados. Assim, utilizou-se a medida quantitativa mais comumente usada, os gráficos de desvio quadrático médio (RMSD, do inglês *Root Mean Square Deviation*), para analisar os 50 ns de simulação de DM gerados para cada um dos sete sistemas formados pela proteína 3MZE e as estruturas dos ligantes. O RMSD é um parâmetro crucial para analisar o equilíbrio das trajetórias de DM, traçado como uma função do tempo para verificar a estabilidade dos átomos do ligante e da estrutura proteica que formam cada sistema ao longo da simulação. É considerado como uma condição necessária para avaliar quantitativamente o quanto a estrutura final se desviou de sua geometria inicial.

Os gráficos de flutuação quadrática média (RMSF, do inglês *Root Mean Squared Fluctuation*) também foram utilizados para estudar o comportamento dos sistemas. O RMSF é uma propriedade física importante usado como um meio de descrever as diferenças de flexibilidade entre os resíduos de uma estrutura proteica durante a trajetória de DM, portanto, é usado para fornecer informações detalhadas sobre as flutuações residuais de cada aminoácido, considerando o movimento de sua cadeia principal, visto que as cadeias laterais apresentam inerente capacidade

de movimento, logo, não é levada em consideração no momento da análise das flutuações principais da proteína.

Para avaliar quantitativamente a espontaneidade da interação ligante-receptor durante a simulação de DM dos sistemas estudados, realizou-se o cálculo de energia livre de ligação por meio do método de MM/GBSA (do inglês *Molecular Mechanics of Generalized Born Surface Area*) (HOU T, 2011) no AMBER 12, que emprega as seguintes equações gerais:

$$\Delta G_{\text{ligação}} = G_{\text{Complexo}} - (G_{\text{receptor}} + G_{\text{ligante}}) \quad (2)$$

$$\Delta G_{\text{ligação}} = \Delta H - T\Delta S \approx \Delta E_{\text{vácuo}} + \Delta G_{\text{solvatado}} - T\Delta S \quad (3)$$

$$\Delta E_{\text{vácuo}} = \Delta E_{\text{eletrostática}} + \Delta E_{\text{VDW}} \quad (4)$$

$$\Delta G_{\text{solvatado}} = \Delta G_{\text{polar}} + \Delta G_{\text{n-polar}} \quad (5)$$

onde o  $\Delta G_{\text{ligação}}$  é a energia livre de ligação total entre o ligante e o receptor, e  $G_{\text{Complexo}}$ ,  $G_{\text{receptor}}$  e  $G_{\text{ligante}}$  são as energias do complexo, receptor e ligante, respectivamente. A energia livre de ligação ( $\Delta G_{\text{ligação}}$ ) é dividida em vários termos: a entalpia ( $\Delta E_{\text{vácuo}}$ ) que é a soma das interações eletrostáticas ( $\Delta E_{\text{eletrostática}}$ ) e van der Waals ( $\Delta E_{\text{VDW}}$ ), a energia livre de solvatação ( $\Delta G_{\text{solvatado}}$ ) que inclui os termos polar ( $\Delta G_{\text{polar}}$ ) e não polar ( $\Delta G_{\text{n-polar}}$ ), e a entropia conformacional ( $T\Delta S$ ) que é a contribuição das mudanças de entropia para a energia livre de ligação.

Por fim, foi realizado os cálculos de decomposição de energia livre por resíduo, com o objetivo de obter a apresentação detalhada das interações inibidor-proteína, quantificando a contribuição energética da interação de cada resíduo e identificando àqueles que apresentam maiores contribuições. As informações quantitativas da contribuição por resíduo no complexo são extremamente úteis para interpretar o modo de ligação dos inibidores com a enzima.

A decomposição foi calculada aplicando o método de MM/GBSA usando o protocolo de decomposição no AMBER 12 (KOLLMAN et al., 2000; TSUI; CASE, 2000) conforme a equação:

$$\Delta G_{\text{inibidor-resíduo}} = \Delta E_{\text{eletrostática}} + \Delta E_{\text{VDW}} + \Delta G_{\text{polar}} + \Delta G_{\text{n-polar}} \quad (6)$$

Onde o termo  $\Delta G_{\text{inibidor-resíduo}}$  que descreve a energia de interação entre inibidor-resíduo é descrito pela contribuição eletrostática ( $\Delta E_{\text{eletrostática}}$ ) e de van der Waals ( $\Delta E_{\text{VDW}}$ ) em vácuo, e solvatação polar ( $\Delta G_{\text{polar}}$ ) e não polar ( $\Delta G_{\text{n-polar}}$ ).

Também realizou-se o cálculo de energia livre de ligação por meio do método quântico QMMM/GBSA, que possibilita ver o comportamento energético por meio de aproximações quânticas de energia, onde todo o sistema é considerado para realizar o cálculo, mas só o resíduo catalítico Ser44 e o ligante, de cada sistema, foram tratados como quânticos.

Por fim, foi utilizado o método MM/GBSA com o protocolo de análises de energia livre de Pin-Chih Su e colaboradores (Pin-Chih Su et al., 2015), para obtenção das variações da energia de van der Waals ( $\Delta G_{vdw}$ ), energia eletrostática ( $\Delta G_{elec}$ ), energia polar ( $\Delta G_{GB}$ ), energia não polar ( $\Delta G_{nonpolar}$ ), energia de solvatação ( $\Delta G_{solv}$ ) e energia livre de ligação total ( $\Delta G_{bind}$ ) durante o tempo de simulação da dinâmica molecular.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

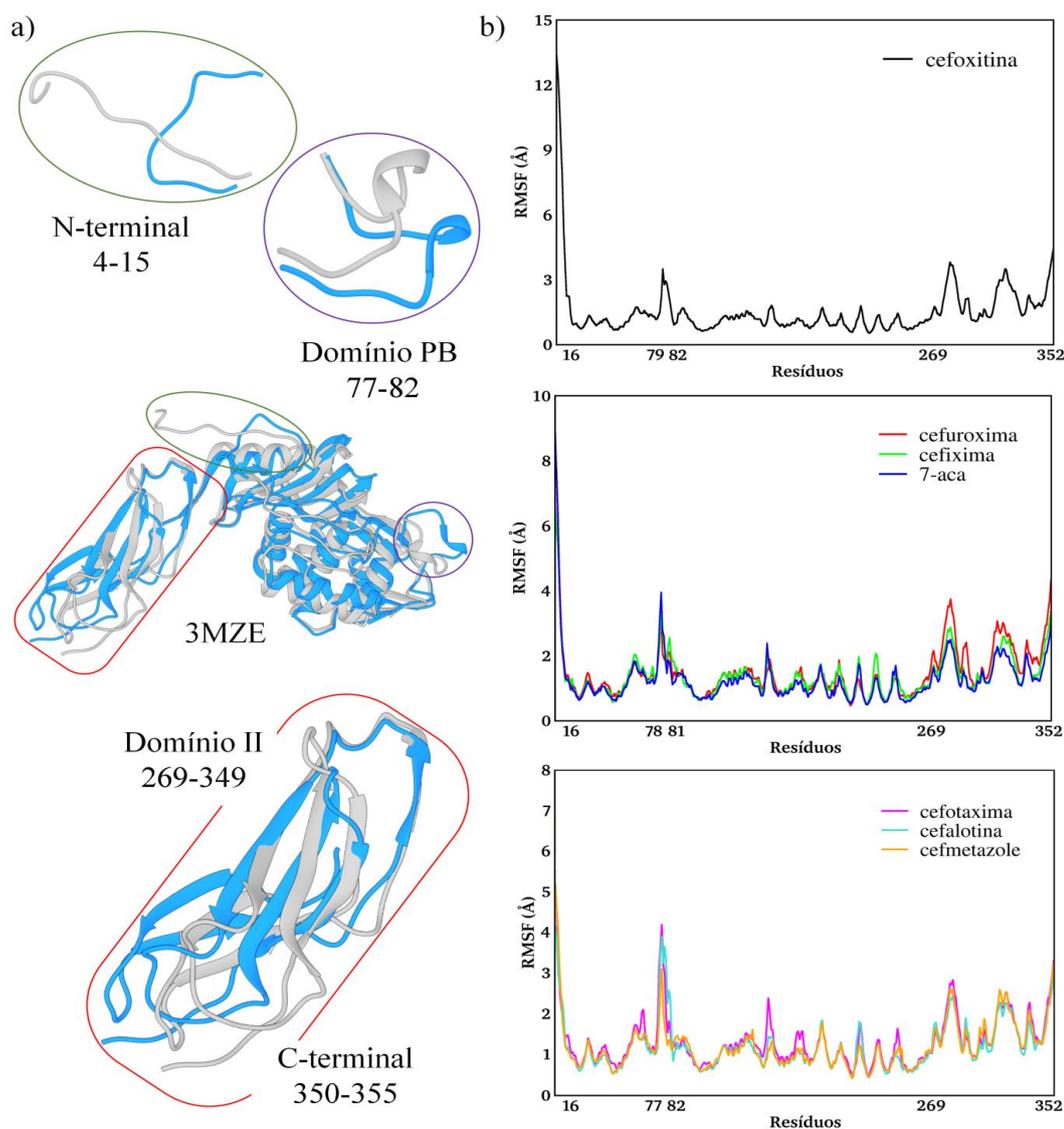
### 5.1 RMSF

As simulações de Dinâmica Molecular (DM), executadas para os sete sistemas, foram analisadas partindo da discussão dos gráficos de flutuação quadrática média (RMSF, do inglês *Root Mean Squared Fluctuation*), devido à necessidade de ilustrar e explicar o comportamento da estrutura do receptor durante a produção de DM.

Observou-se que a proteína 3MZE sofreu grandes variações conformacionais em algumas regiões de sua estrutura. Essas regiões são zonas de alta flexibilidade formadas pelos resíduos de numeração 4-15 do N-terminal, juntamente com os resíduos 77-82 da alça do domínio PB, mais os resíduos 269-349 do domínio II e também o C-terminal que compreende os resíduos de numeração 350-355, destacados à esquerda na figura 11, onde a estrutura conformacional de coloração cinza representa a proteína no início da DM, e a de coloração azul representa a conformação mais mimetizada pelo receptor, ou seja, é a conformação que apresentou maior população, em frames, extraída pelo modo de clusterização das estruturas ao final da simulação de DM, indicando que esta é a conformação que mais representa o comportamento geral da proteína (Figura 11a).

Os gráficos de RMSF da estrutura do receptor nos sistemas formados com cada ligante são bastante claros e conclusivos para auxiliar na determinação do conjunto de resíduos que sofre com estas flutuações observadas durante as simulações de DM. Para cada um dos sete sistemas foi analisado o comportamento do receptor e o primeiro gráfico de RMSF é para o complexo com a cefoxitina, o segundo gráfico combina o receptor dos sistemas da cefuroxima, cefixima e 7-ACA e o terceiro gráfico traz o comportamento do receptor dos sistemas da cefotaxima, cefalotina e cefmetazole (Figura 11b).

**Figura 11** – a) estrutura da proteína 3MZE destacando as regiões de maior flutuação; b) gráfico de RMSF (Å) para os receptores em cada um dos sete sistemas



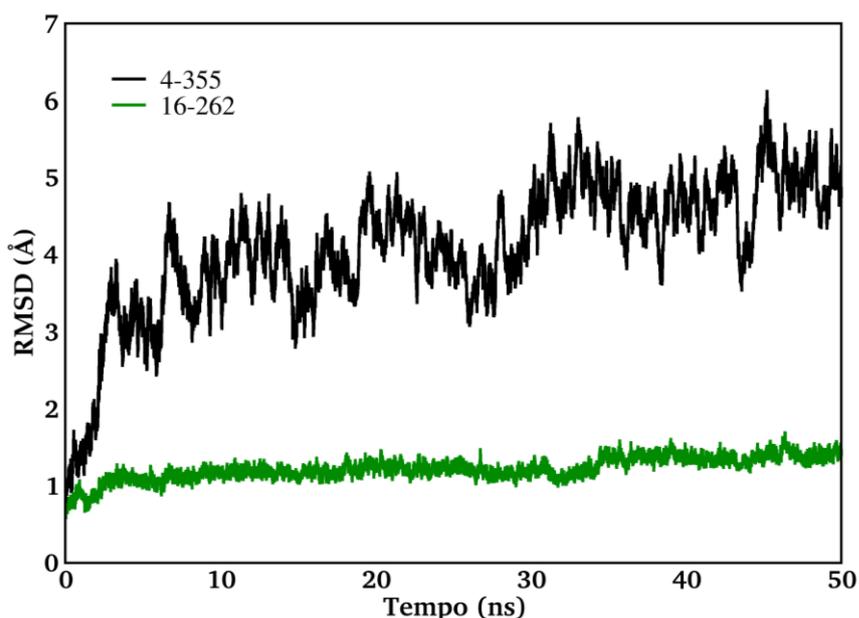
**Fonte:** dados extraídos desta pesquisa.

É possível observar a partir dos gráficos de RMSF que todos os sistemas apresentaram o mesmo padrão de flutuações, onde a região do N-terminal foi a principal zona de flexibilidade na estrutura da proteína, alcançando aproximadamente 15 Å para o complexo com a cefoxitina, entre 6 e 8 Å no segundo gráfico e entre 4 e 5 Å no terceiro. A região de alça destacada entre os resíduos 77-82 do domínio PB mostrou a mesma variação no gráfico para todos os sistemas, ficando com flutuação entre 3 e 4 Å, devido sua flexibilidade estrutural. Para os resíduos do domínio II e do C-terminal no complexo com a cefoxitina e no segundo gráfico a flutuação chega até 4 Å e essa mesma região no terceiro gráfico tem

flutuações até 3 Å, pois essa é uma região que comporta alças e folhas-β que conferem bastante movimento às estruturas proteicas. Analisando a região do gráfico referente aos resíduos do sítio ativo de ligação (Ala43, Ser44, Lys47, Lys84, Ser86, Ser87, Asn112, Leu153, Arg198, Thr214, Gly215, His216, Thr217, Phe245 e Arg248), observa-se que a interação com os ligantes conduziu ao menor grau de flexibilidade destes resíduos, apresentando valores de RMSF inferiores a 2 Å.

Conferindo o gráfico de RMSD da estrutura do receptor (Gráfico 1), pode-se verificar o efeito que as regiões de maior flutuação causam na variação média da proteína, principalmente a região do domínio II, responsável pelas maiores flutuações no gráfico de RMSF. Na trajetória de coloração preta foi apresentada a variação dos resíduos de 4-355, que representam todos os aminoácidos o receptor, e observa-se desvios médios acima de 3 Å chegando até 6 Å a partir dos 30 ns de simulação, em comparação à trajetória de coloração verde escuro que traz a variação média apenas dos resíduos do domínio PB, de numeração 16-262, que mantém total estabilidade em sua estrutura, por ser constituído predominantemente de α-hélices. Nesse domínio responsável pela interação com os inibidores estão contidos, portanto, os aminoácidos do sítio ativo, vistos nos gráficos de RMSF com flutuações abaixo de 2 Å, logo, espera-se que juntamente com os ligantes, esses sistemas formem complexos com boa estabilidade.

**Gráfico 1** – RMSD (em Å) da estrutura do receptor de 4-355 (em preto) e dos resíduos do domínio PB 16-262 (em verde escuro) *versus* tempo de DM (em ns)



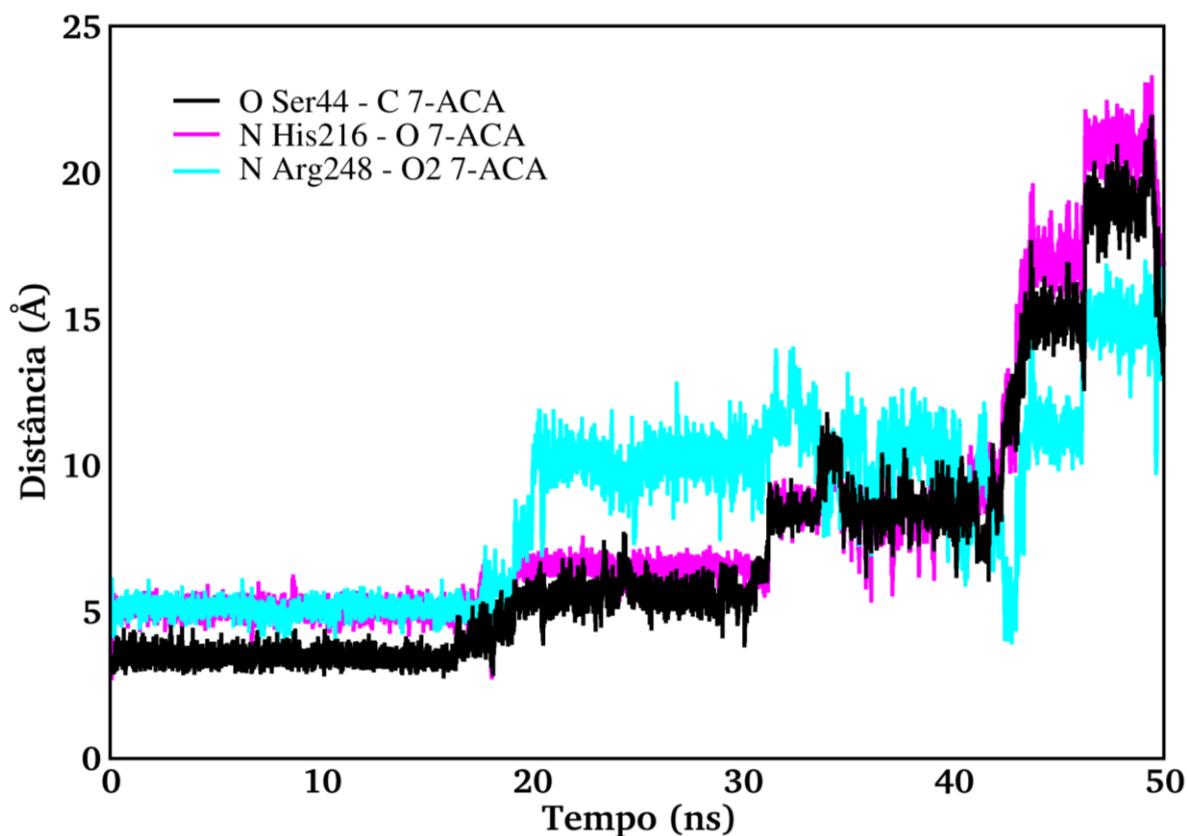
Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

Além do mais, como já foi discutido, o domínio PB determina a singularidade funcional da enzima e a deleção da porção da proteína a partir do resíduo 263 (início do domínio II) não interfere na afinidade da enzima à compostos  $\beta$ -lactâmicos, portanto, o comportamento do domínio II não será avaliado nas análises de RMSD.

## 5.2 Sistema com o ligante ácido 7-aminocefalosporânico (7-ACA)

A partir da análise da simulação de DM para o ligante 7-ACA, verificou-se que seu comportamento molecular não se assemelhou aos demais ligantes no sítio ativo da enzima. No gráfico da distância ao longo do tempo de simulação (Gráfico 2) observou-se o distanciamento gradativo do 7-ACA em relação aos aminoácidos catalíticos Ser44, atingindo distância média de 7,16 Å, His216, chegando a 8,23 Å e Arg248, com 8,55 Å e 9,61 Å em relação aos átomos de nitrogênio N1 e N2 do resíduo para os átomos de oxigênio O2 e O1, respectivamente, do grupo carboxila ligado ao anel di-hidrotiazínico do ligante.

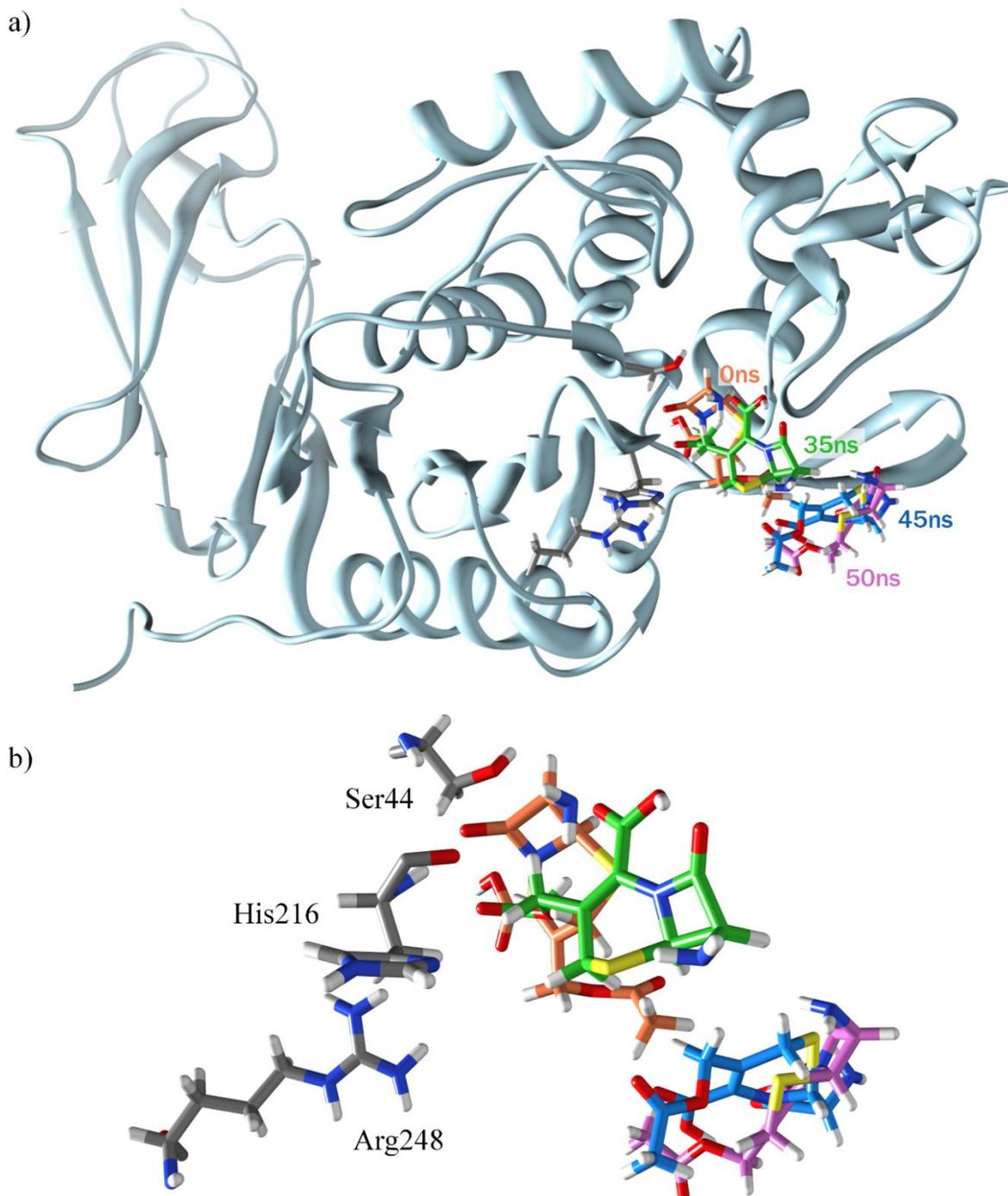
**Gráfico 2** – Distâncias (em Å) em relação ao tempo de simulação (em ns) das interações do ligante 7-ACA com os aminoácidos Ser44, His216 e Arg245(N1-O2)



Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

Portanto, é possível concluir que houve o afastamento completo do ligante em relação ao sítio ativo de ligação, como mostrado na figura 12, não formando complexo estável com a proteína 3MZE e não realizando as devidas interações com os aminoácidos catalíticos. A figura 12a apresenta o complexo enzimático com o ligante 7-ACA em diferentes pontos da dinâmica molecular mostrando seu gradativo afastamento. E na figura 12b são mostrados os resíduos catalíticos Ser44, His216 e Arg248 e também as estruturas do ligante 7-ACA nas diferentes posições espaciais que ele assume em diferentes momentos da DM, onde a estrutura de cor laranja representa a estrutura do 7-ACA no momento inicial da DM localizado ainda na cavidade do sítio ativo de ligação, em cor verde é referente à posição do ligante aos 35ns já com um acentuado afastamento dos resíduos catalíticos do sítio, em cor azul observa-se o 7-ACA aos 45 ns já fora do sítio ativo de ligação e finalmente em cor rosa é apresentada a estrutura do ligante aos 50 ns de DM em sua posição espacial final, completamente distante dos resíduos e fora do sítio ativo.

**Figura 12** – a) complexo enzimático da PBP5 e a estrutura do ligante 7-ACA em pontos diferentes da DM; b) resíduos catalíticos Ser44, His216 e Arg148 e a estrutura do 7-ACA no início da DM (cor laranja), aos 35ns (cor verde), aos 45 ns (cor azul) e aos 50ns (cor rosa)



**Fonte:** dados extraídos desta pesquisa.

Esse composto assume tal comportamento devido à especificidade de sua estrutura molecular, onde há ausência dos longos radicais laterais que são substituídos nas posições R<sup>1</sup> e R<sup>2</sup> do núcleo cefalosporínico (Figura 8b), que

realizam as interações que estabilizam o ligante no sítio ativo e sua extrema importância é comprovada quando observa-se que o ligante deficiente desses radicais não se estabiliza e nem forma complexo com a enzima.

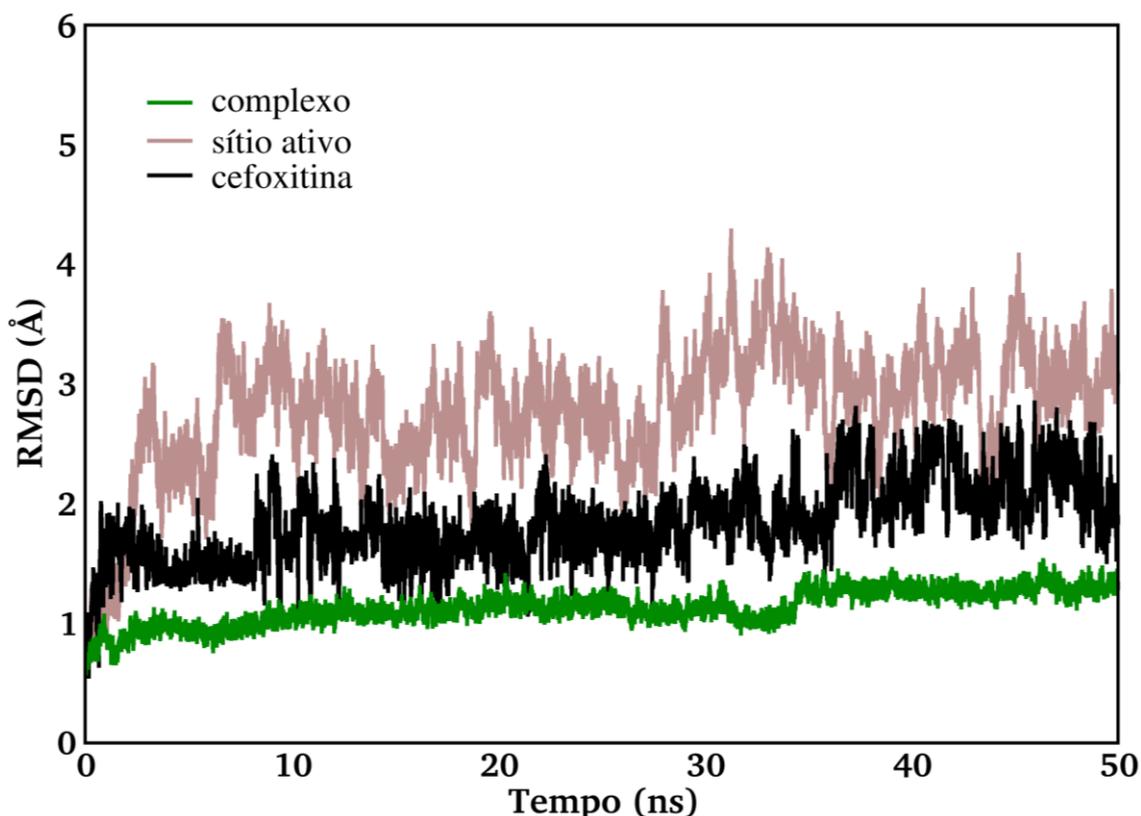
### 5.3 RMSD e Decomposição

A partir da formação das trajetórias de DM foram gerados os gráficos de RMSD e de energia de interação por resíduo, que permitiram analisar o comportamento das estruturas e suas modificações conformacionais, e as contribuições energéticas de cada resíduo dos sistemas ao longo das simulações.

#### 5.3.1 Ligante cristalográfico cefoxitina

O gráfico 3, RMSD do sistema formado pelo receptor 3MZE com o ligante cristalográfico cefoxitina, revela que o comportamento geral desse sistema é bastante estável. É notável a grande estabilidade da trajetória do complexo que apresenta apenas 1 Å de variação, em verde escuro, formado pelo ligante e o domínio PB da proteína.

**Gráfico 3** – RMSD (em Å) do sistema 3MZE e o ligante cristalográfico cefoxitina *versus* o tempo de DM (em ns)



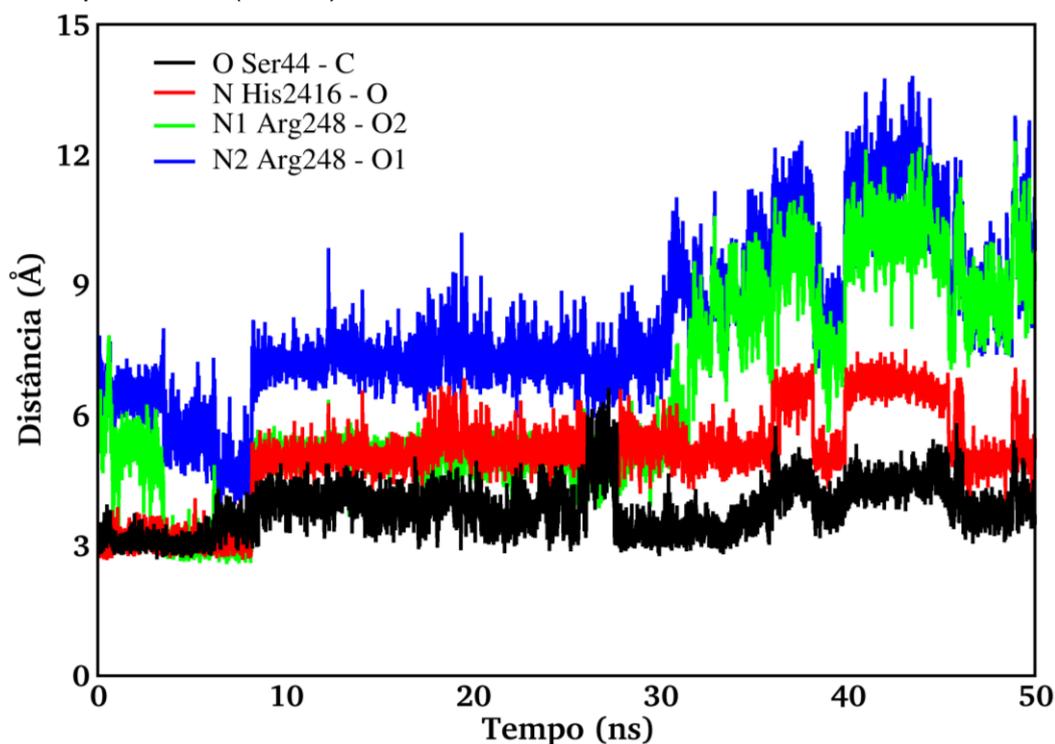
Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

A análise do comportamento do ligante, na cor preta, mostra que a cefoxitina sofreu alguns desvios durante os 50 ns de DM. Na região de 8 ns a 12 ns observam-se pequenas variações com picos de até 2,4 Å no eixo do RMSD, retomando a estabilidade da trajetória do ligante com RMSD abaixo de 2 Å, bem como no intervalo entre 36 ns e 42 ns, onde também há variações de até 2,6 Å na trajetória da cefoxitina, que recupera estabilidade com RMSD abaixo de 2,5 Å.

Observa-se na trajetória de cor marrom, referente ao sítio ativo de ligação, ainda no gráfico 3, que esses resíduos apresentam variações em torno de 3 Å até 27 ns de simulação, um pico de 4,2 Å em aproximadamente 31 ns e mantém-se em torno de 3,5 Å até os 50 ns. A análise das variações dos aminoácidos do sítio ativo considera a cadeia principal, portanto observa-se que estes resíduos buscam estabilidade em sua conformação, e suas variações em relação à estrutura inicial são devido ao acoplamento do ligante.

Estudando o sítio ativo de ligação de maneira mais quantitativa, são apresentadas no gráfico 4 as distâncias de interação entre os aminoácidos catalíticos do sistema e o ligante cristalográfico cefoxitina. As interações consideradas são com os resíduos Ser44, His216 e Arg248.

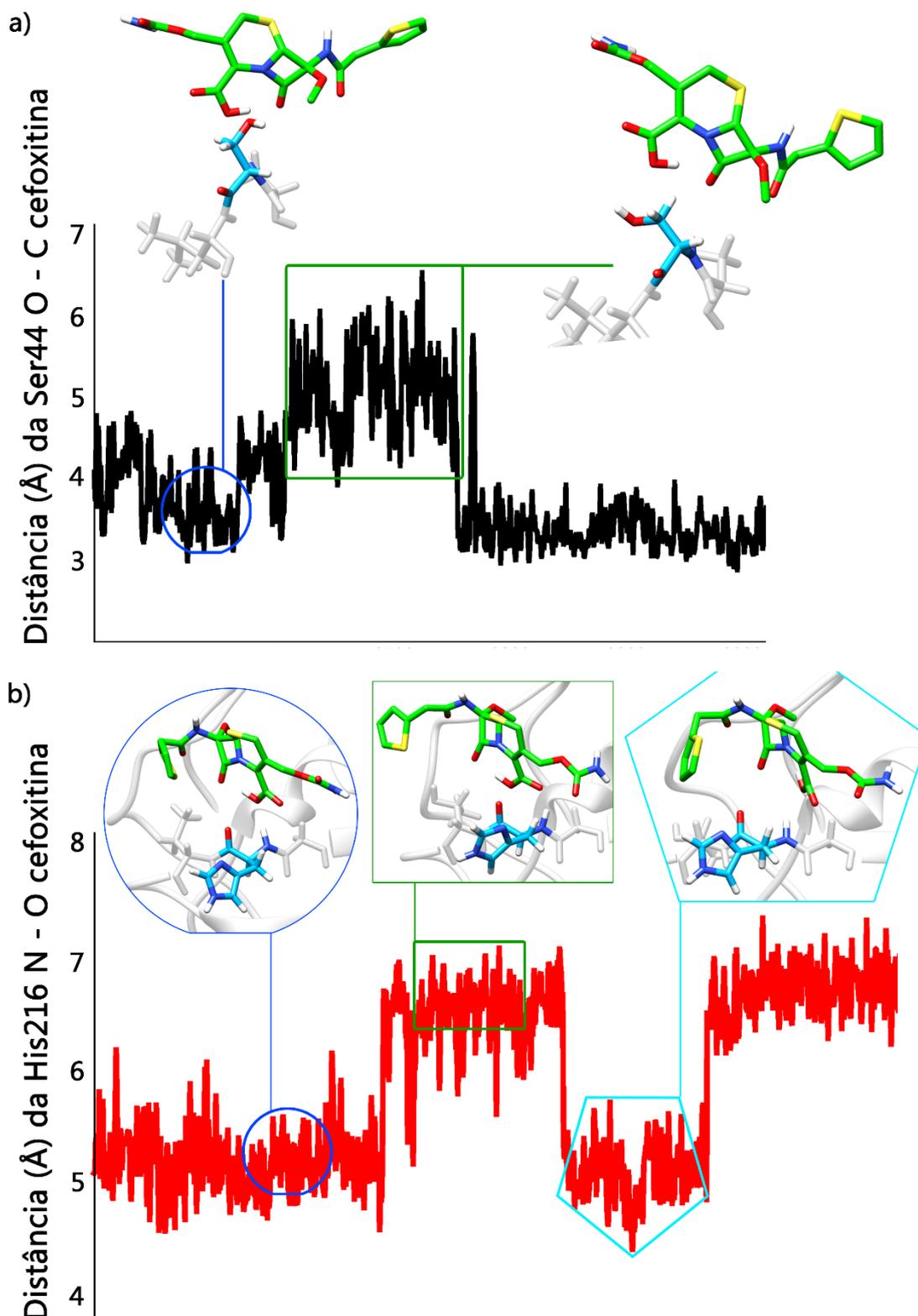
**Gráfico 4** – Distâncias de interação (em Å) com o ligante cristalográfico cefoxitina *versus* tempo de DM (em ns)



Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

É notável que estas interações com os resíduos catalíticos não exibem forte caráter de estabilidade, portanto têm elevada variação em suas distâncias de interação. As interações destacadas com o aminoácido catalítico Arg248 não são estáveis e tem valores de distância bastante elevados. Na interação com o aminoácido catalítico Ser44 acontece um salto entre 26 ns até pouco mais que 27 ns levando a distância até 6,58 Å, assim como na interação com a His216 catalítica, que sofre com algumas mudanças a partir dos 36 ns de DM, essas ocorrências são ilustradas na figura 13, onde a figura 13a mostra a conformação na interação do átomo de oxigênio O da Ser44 catalítica com o átomo de carbono C da carbonila do anel  $\beta$ -lactâmico do ligante no sítio ativo da proteína no instante anterior à 26 ns, destacado pelo indicador azul, e o indicador verde mostra a conformação assumida entre 26 ns e 27 ns. A figura 13b apresenta as conformações da interação do átomo de nitrogênio N da cadeia principal da His216 com o átomo de oxigênio O da carbonila do anel  $\beta$ -lactâmico do ligante, onde o indicador azul escuro destaca a conformação antes dos 36 ns, o indicador verde mostra o intervalo entre 36 ns e 38 ns e o indicador azul claro destaca a conformação no instante entre 38 ns e 39 ns,

**Figura 13** – Mudanças conformacionais ao longo das interações; (a) Ser44 catalítica com o ligante cristalográfico cefoxitina; (b) His216 catalítica com a cefoxitina



Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

Portanto, a partir da figura 13a foi possível observar que não só a flexibilidade do ligante foi responsável pelo aumento da distância, mas sim que o aminoácido Ser44 catalítico sofreu uma rotação na estrutura da sua cadeia lateral, gerando o pico observado nesse intervalo. E na figura 13b é possível observar o distanciamento dos átomos devido à um movimento da cadeia lateral da histidina, que logo volta à sua conformação anterior e o ligante já apresenta rotação do grupo carboxílico e do anel di-hidrotiazínico. Os movimentos sofridos pelos resíduos e pelo ligante influenciaram para ocorrer os aumentos nos valores das distâncias durante as interações.

A tabela 1 traz os valores de distâncias médias das interações entre os resíduos e o ligante, indicando os intervalos onde acontecem as variações.

**Tabela 1** – Distâncias de interação (em Å) entre os resíduos catalíticos da 3MZE e a cefoxitina

Interação	Intervalo	Distância média (Å)	Distância média total (Å)
<b>O Ser44 – C cefoxitina</b>	0 ns – 26 ns	3,69	3,84
	28 ns – 50 ns	3,93	
<b>N His216 – O cefoxitina</b>	0 ns – 8 ns	3,1	5,05
	8 ns – 36 ns	5,16	
<b>N1 Arg248 – O2 cefoxitina</b>	8 ns – 30 ns	5,05	6,4
<b>N2 Arg248 – O1 cefoxitina</b>		7,28	8,03

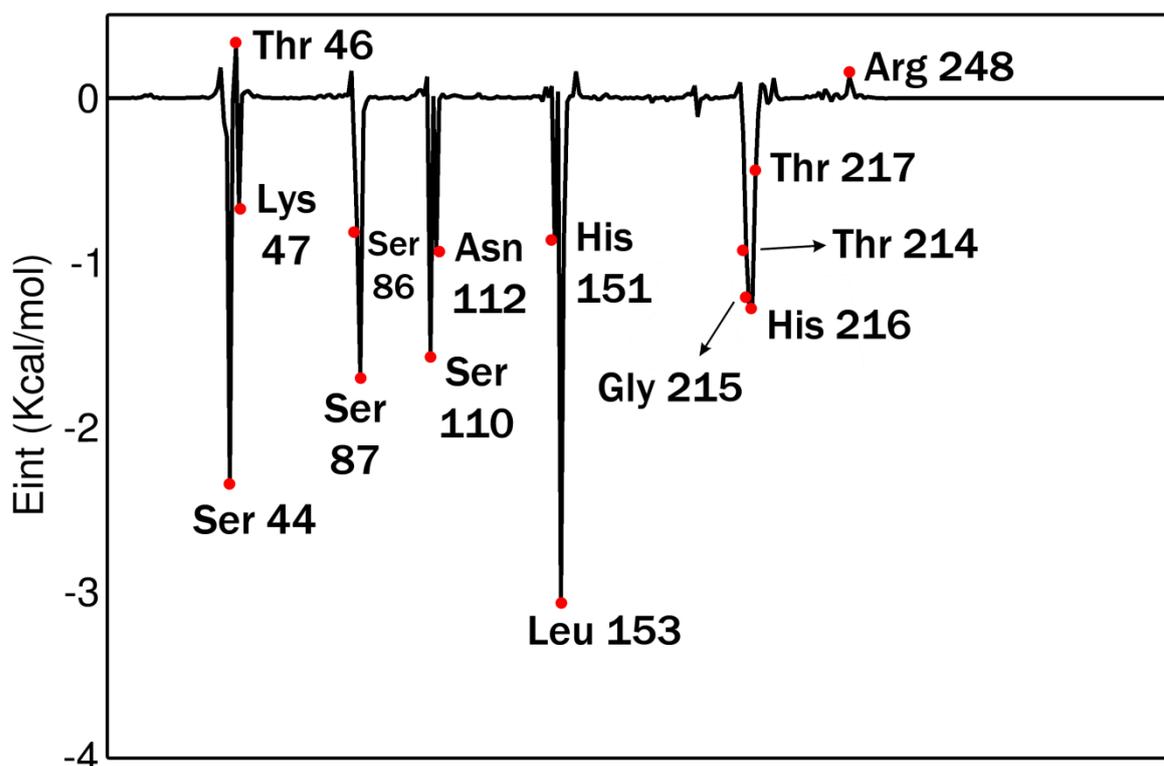
Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

Observando os valores da tabela, ressalta-se que a distância média total na interação entre a Ser44 catalítica e o ligante, que é de 3,84 Å, sofre influência com a ocorrência de pontos de instabilidade ao longo da DM, mas não é descartada a possibilidade de uma interação, visto que houve proximidade entre o resíduo e o ligante em muitos pontos da DM, e também que as distâncias médias para os resíduos catalíticos His216, 5,05 Å, e Arg248, 6,4 Å e 8,03 Å, são muito elevadas, demonstrando instabilidade de ligação e não confirmado uma interação mais estável.

O gráfico 5 apresenta o resultado do cálculo de decomposição de energia livre por resíduo para o ligante cefoxitina, mostrando as diferenças de energias livres de interação para cada resíduo da proteína (4-355). Os valores negativos no eixo Y do gráfico, referente às energias de interação ( $E_{int}$ , em Kcal/mol), representam energias favoráveis para a interação, no qual estes resíduos contribuem

energeticamente de modo atrativo com o ligante, enquanto que os valores positivos, neste mesmo eixo, representam energias desfavoráveis, contribuindo de modo repulsivo.

**Gráfico 5** – Energias de interação ( $E_{int}$ , em Kcal/mol) entre os resíduos da 3MZE e o ligante cristalográfico cefoxitina



**Fonte:** dados extraídos desta pesquisa.

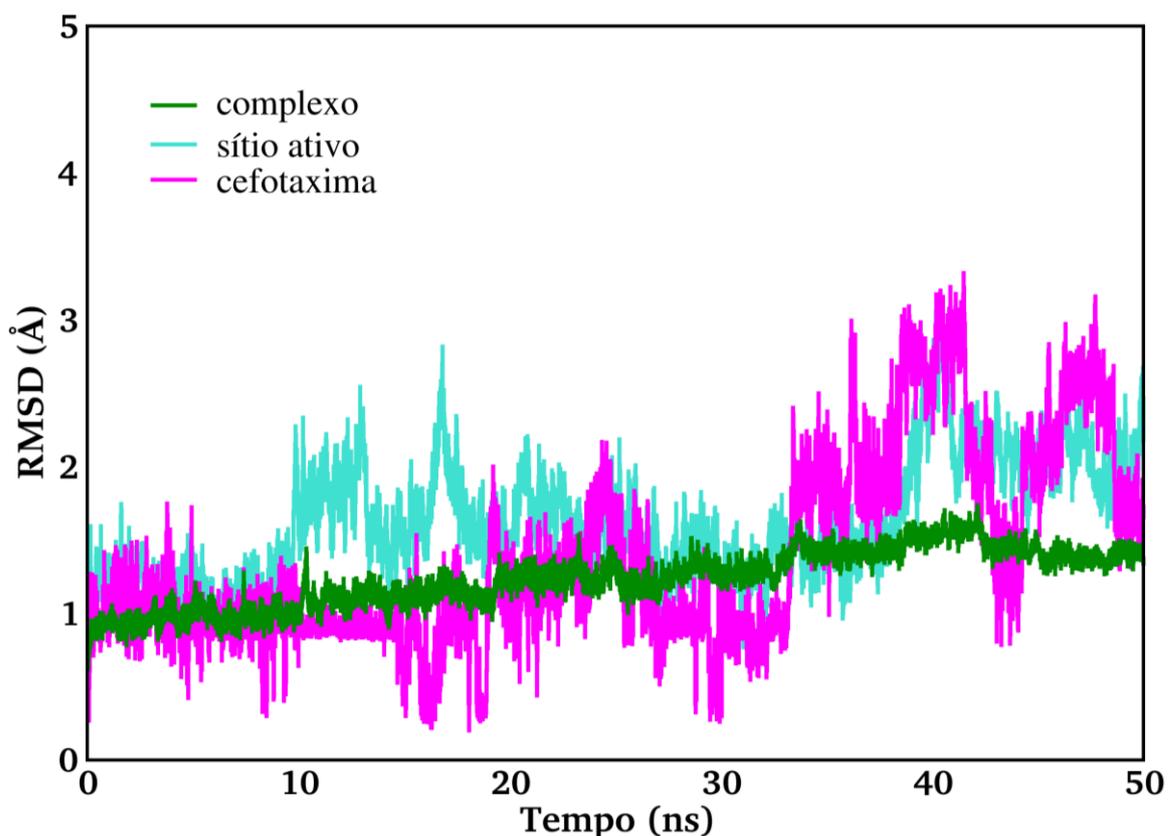
A análise do gráfico 5 permite observar que a contribuição energética mais favorável está relacionada ao resíduo Leu153, com energia de -3,053 Kcal/mol, acompanhado da Ser44 catalítica, que tem -2,329 Kcal/mol, influenciado pelas regiões da dinâmica molecular em que houve proximidade entre o resíduo e o ligante. Outras contribuições favoráveis também se destacam, como para os resíduos Ser87 (-1,674 Kcal/mol), Ser110 (-1,545 Kcal/mol), Gly215 (-1,253 Kcal/mol) e His216 catalítica (-1,257 Kcal/mol). Esse grande número de contribuições energeticamente favoráveis para o sistema demonstram que o ligante exerce fortes interações dentro do sítio ativo, garantindo sua permanência na cavidade catalítica e a potencial inativação da função enzimática. Em adição, vários resíduos ofereceram contribuições favoráveis em menor escala energética, isso foi observado para os resíduos Lys47, Ser86, Asn112, His151, Thr214 e Thr217 que

têm valores de  $E_{int}$  entre 0,5 Kcal/mol e 1 Kcal/mol. Em destaque, também é observado que os resíduos Thr46 e Arg248 catalítica têm contribuição energética desfavorável para o sistema, com valores de  $E_{int}$  maiores que zero, confirmando os resultados obtidos pelo gráfico 4 das distâncias de interação, onde a Arg248 não mantém interação estável com o ligante. A energia de  $\Delta G$  relacionada a este sistema é de -31,471 Kcal/mol, indicando que o complexo tem energia bastante favorável na interação com o ligante, devido aos resíduos que apresentaram boas energias de interação.

### 5.3.2 Ligante cefotaxima

O gráfico 6 traz as análises das trajetórias para sistema formado com o ligante cefotaxima. É possível observar que o complexo se mantém com variação média de 1 Å até 20 ns de simulação, intervalo em que o ligante também se comporta de maneira estável, com RMSD abaixo de 1,5 Å.

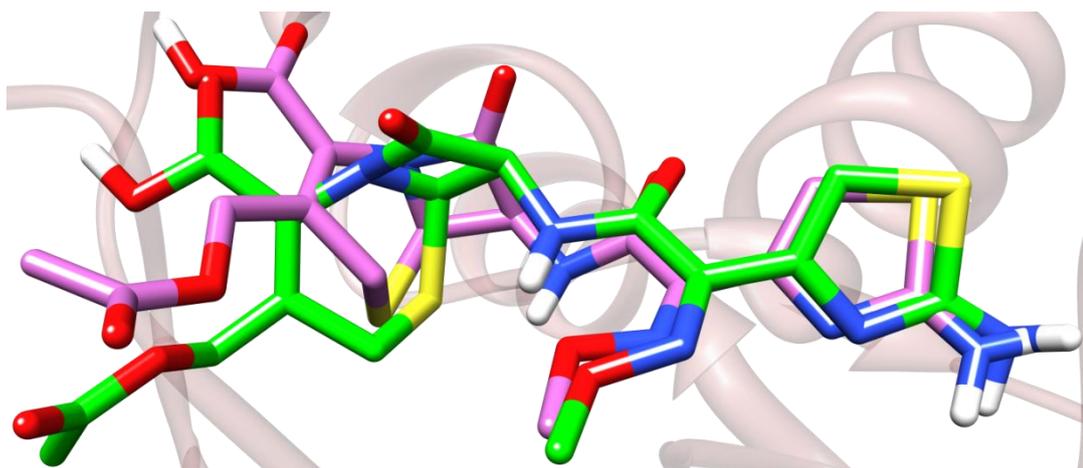
**Gráfico 6** – RMSD (em Å) do sistema 3MZE e o ligante cefotaxima *versus* o tempo de DM (em ns)



Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

O sítio ativo apresenta RMSD entre 1 Å e 2 Å com pequenas variações e um pico de 3 Å, que são atribuídas às cadeias laterais dos aminoácidos, que possuem graus de liberdade de movimento inerentes. Em aproximadamente 20 ns o ligante começa a apresentar tendência para a instabilidade, alcançando picos de 2 Å e levando o complexo à RMSD de 1,3 Å até aproximadamente 26 ns de DM. Entre 26 ns e 33 ns o ligante volta a apresentar baixa variação, com RMSD em 1 Å e o complexo segue com 1,3 Å. A partir dos 33 ns de simulação o ligante se desestabiliza, variando com RMSD acima de 2 Å e picos de até 3 Å, o complexo então chega a 1,5 Å nesse mesmo eixo. A figura 14 mostra a estrutura da cefotaxima em diferentes pontos que se destacaram na trajetória da DM.

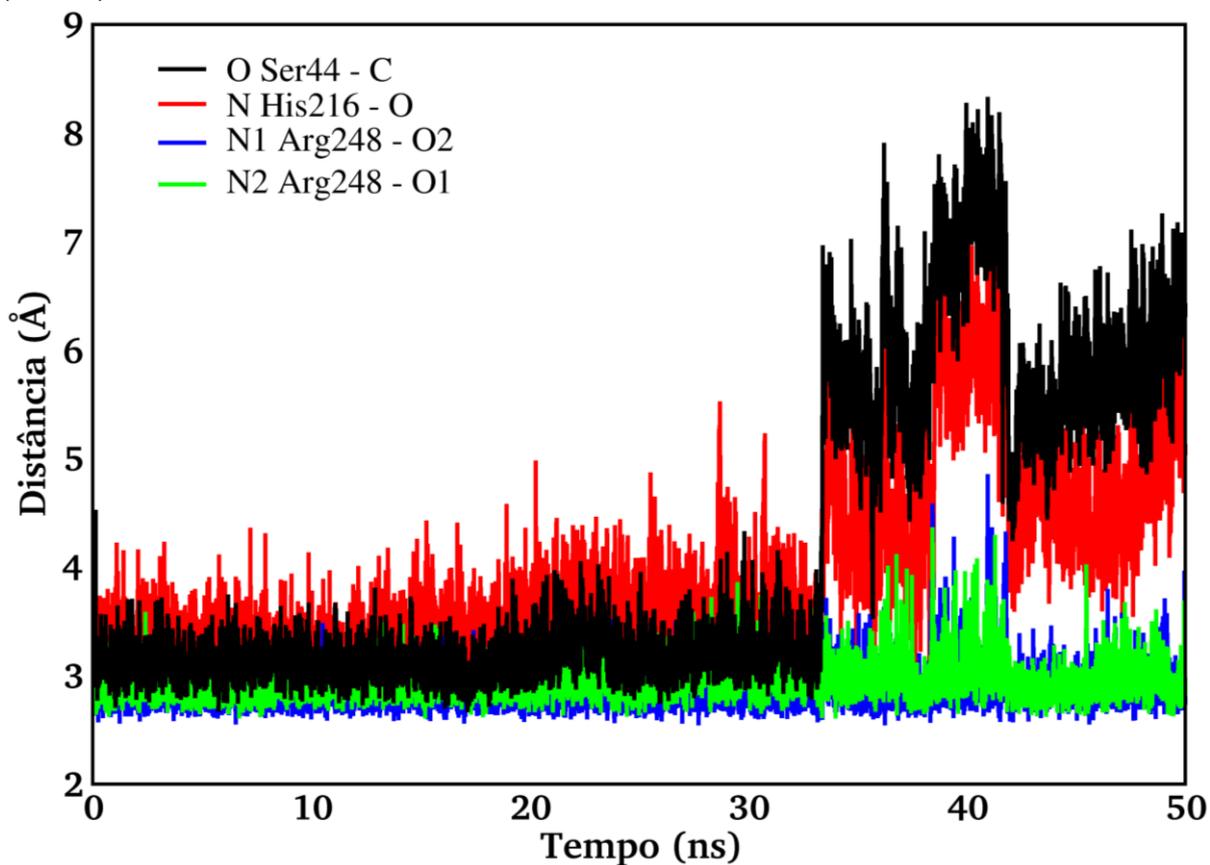
**Figura 14** – Estrutura do ligante cefotaxima antes dos 33 ns (cor rosa) e depois dos 33 ns (cor verde)



**Fonte:** dados extraídos desta pesquisa.

A partir da figura é possível observar as diversas mudanças conformacionais que ocorrem em toda estrutura do ligante, que fizeram sua trajetória de RMSD não alcançar a estabilidade. Mas a mudança conformacional de maior notoriedade sofrida pelo ligante acontece aos 33 ns, pois esse comportamento também pode ser observado no gráfico 7, que apresenta as variações das distâncias de interação entre o ligante cefotaxima e os resíduos catalíticos Ser44 e His216, e mostra também que a interação com o aminoácido catalítico Arg248 permanece constante durante toda simulação.

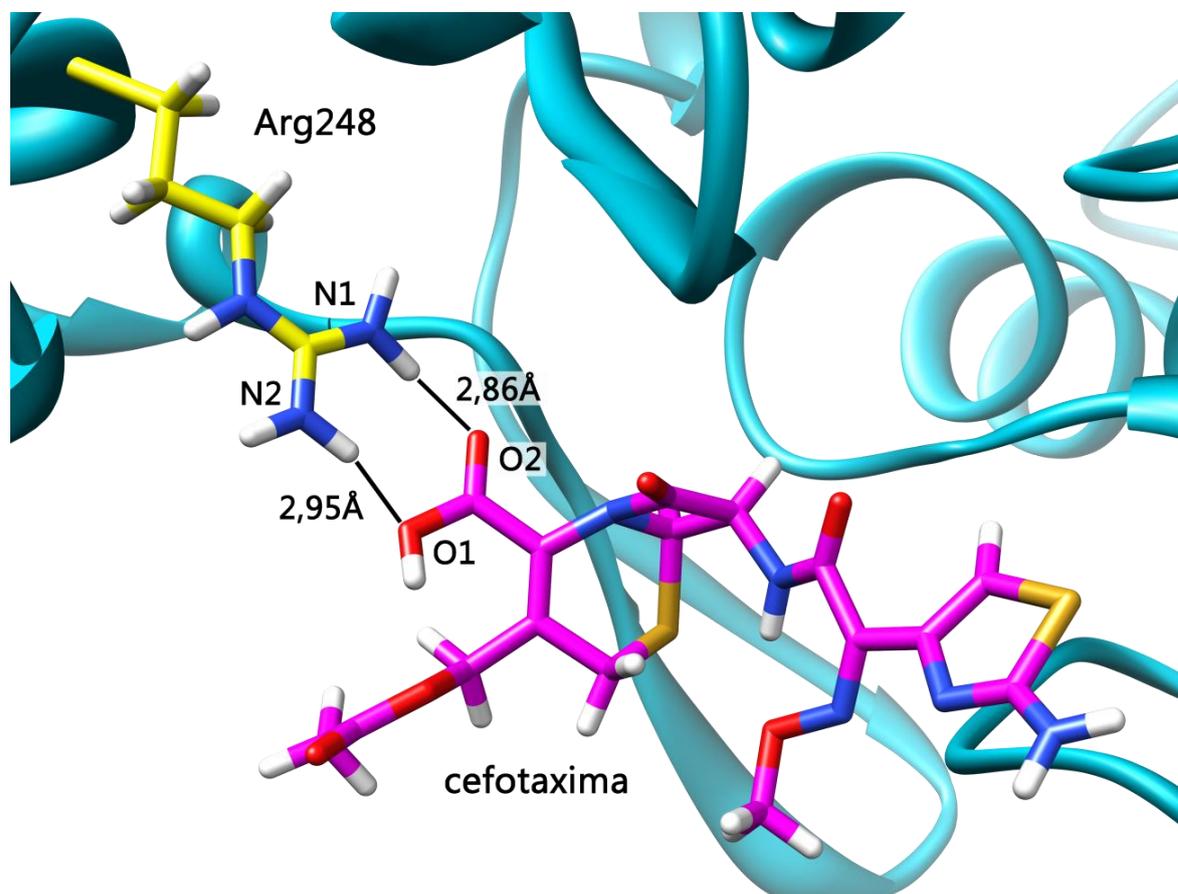
**Gráfico 7** – Distâncias de interação (em Å) com a cefotaxima *versus* tempo de DM (em ns)



Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

Nota-se nitidamente que a interação entre o aminoácido catalítico Arg248 e o grupo carboxílico ligado ao anel di-hidrotiazínico do ligante permanece constante durante todos os 50 ns de simulação, essa interação está ilustrada na figura 15.

**Figura 15** – Interação entre o resíduo catalítico Arg248 e o ligante cefotaxima (cor rosa)



**Fonte:** dados extraídos desta pesquisa.

Apesar de todos os movimentos sofridos pela estrutura do ligante ao longo da simulação de DM, as interações entre os átomos destacadas na imagem permanecem estáveis, pois a cadeia lateral da Arg248 catalítica acompanha o movimento do ligante e mantém estabelecidas as interações. A distância média obtida para a interação entre o átomo de nitrogênio N1 da Arg248 e o átomo de oxigênio O2 do ligante é de 2,86 Å, e entre o átomo de nitrogênio N2 da Arg248 e o átomo de oxigênio O1 do ligante a distância média é de 2,95 Å, indicando que são interações bastante estáveis durante toda DM. Entretanto, observa-se claramente no gráfico 7, que a partir dos 33 ns de simulação as interações com os aminoácidos catalíticos Ser44 e His216 deixam de ser constantes, e passam a sofrer grandes variações. A tabela 2 auxilia na compreensão dos dados do gráfico e na visualização dos valores médios das distâncias de interação.

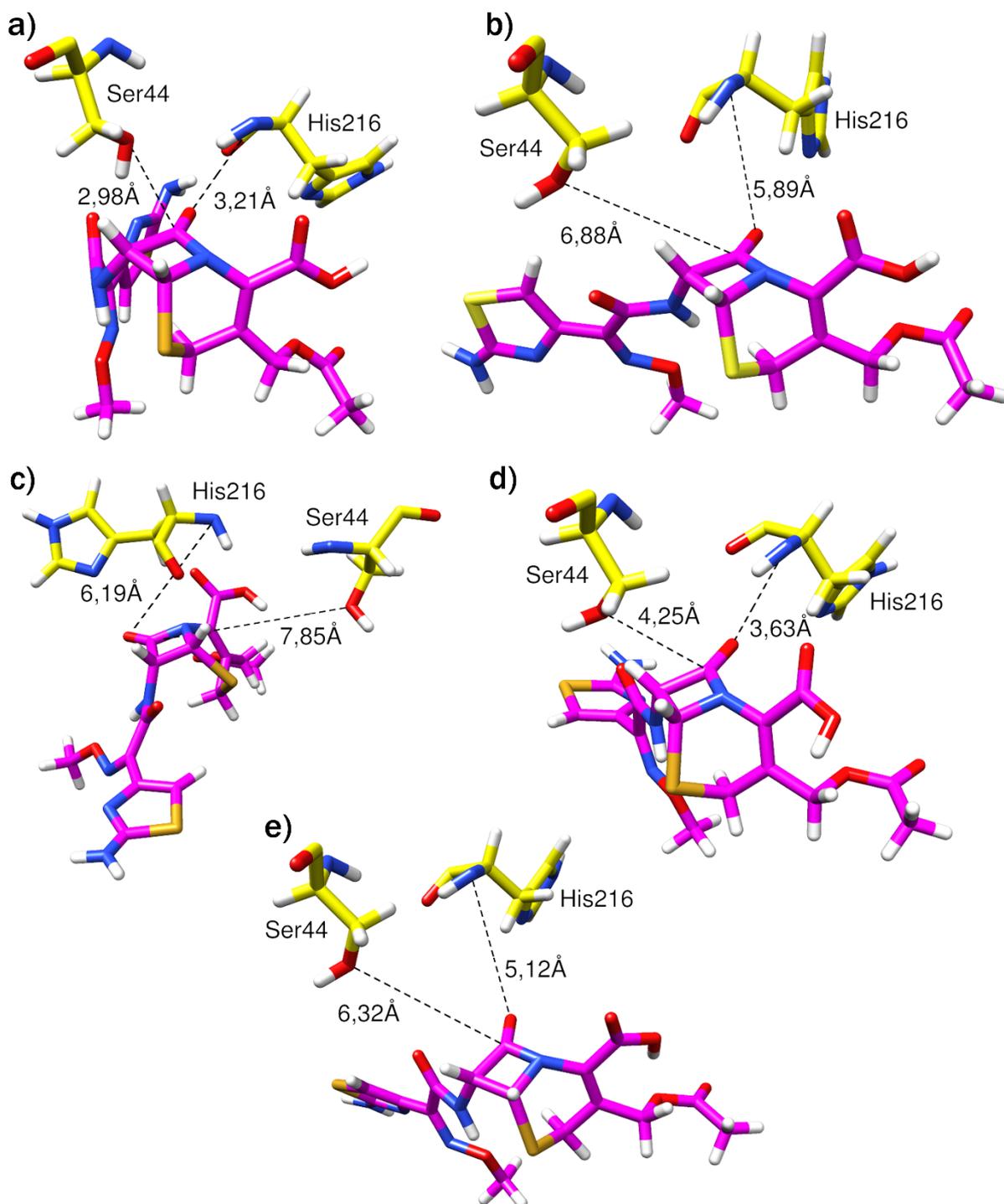
**Tabela 2** – Distâncias de interação (em Å) entre os resíduos catalíticos da 3MZE e o ligante cefotaxima

<b>Interação</b>	<b>Intervalo</b>	<b>Distância média (Å)</b>	<b>Distância média total (Å)</b>
<b>O Ser44 – C cefotaxima</b>	0 ns – 33 ns	3,16	4,1
	33 ns – 50 ns	5,98	
<b>N His216 – O cefotaxima</b>	0 ns – 33 ns	3,45	3,91
	33 ns – 50 ns	4,83	

**Fonte:** dados extraídos desta pesquisa.

A interação do átomo de oxigênio O do resíduo catalítico Ser44 com o átomo de carbono carbonílico do anel  $\beta$ -lactâmico do ligante cefotaxima mantém-se até os 33 ns de simulação de DM, com distância média de 3,16 Å e poucas variações. Nesse mesmo intervalo, o átomo de nitrogênio N da cadeia principal da His216 catalítica interage com o átomo de oxigênio O da carbonila do anel  $\beta$ -lactâmico do ligante com distância média de 3,45 Å, esse valor um pouco mais elevado é devido aos picos de distância acima de 4 Å e até 5 Å em alguns momentos da dinâmica. Mas a partir dos 33 ns, essas duas interações se distanciam muito e sofrem grandes variações, alcançando um pico de até 8,32 Å e 7,31 Å, respectivamente, em aproximadamente 41 ns de DM. Essas variações elevam as distâncias médias, no intervalo de 33 ns a 50 ns, para 5,98 Å e 4,83 Å, na interação com a Ser44 catalítica e His216 catalítica, respectivamente. A figura 16 permite visualizar as mudanças de conformação que ocorrem na estrutura do ligante e nas cadeias laterais dos aminoácidos catalíticos Ser44 e His216 que causaram as variações nas distâncias de interação com o ligante.

**Figura 16** – Resíduos catalíticos Ser44 e His216 (cor amarelo) e a estrutura do ligante cefotaxima (cor rosa) em diferentes momentos da dinâmica molecular; a) no início da DM; b) 33 ns; c) 41 ns; d) 42 ns e e) 50ns



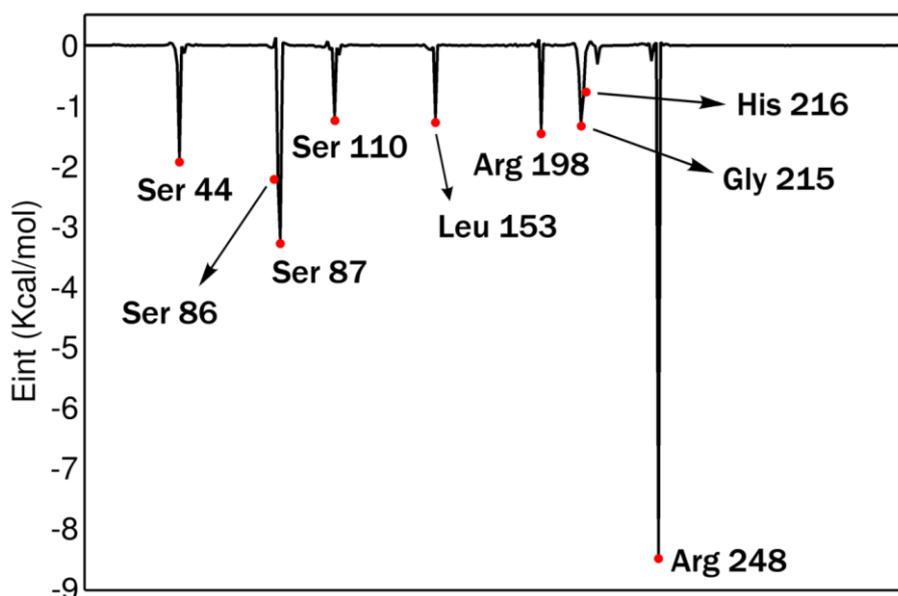
**Fonte:** dados extraídos desta pesquisa.

Na figura, é possível notar o distanciamento entre o ligante e os resíduos catalíticos apresentados, Ser44 e His216, isso se dá devido aos movimentos

sofridos pelas cadeias laterais destes resíduos e também pela alta variação conformacional do ligante, onde é possível observar que o grande radical ligando ao anel  $\beta$ -lactâmico comanda as mudanças conformacionais do ligante, que ora apresenta sua estrutura aberta, como 33 ns, 41 ns e 50 ns, e ora apresenta sua estrutura fechada, no início da DM e em 42 ns.

O gráfico de decomposição de energia do sistema formado pelo ligante cefotaxima (Gráfico 8) traz resultados consonantes à análise do gráfico de distâncias de interação com os aminoácidos catalíticos. Uma vez que a observação das contribuições energéticas individuais dos resíduos da enzima constatam que o ligante não mantém as principais interações dentro do sítio ativo de ligação, confirmando-se que as interações entre os aminoácidos catalíticos Ser44 e His216 são energeticamente pouco favoráveis, com  $E_{int}$  igual a -1,889 Kcal/mol e -0,846 Kcal/mol, respectivamente. Entretanto, não foram só os efeitos desses dois aminoácidos os únicos responsáveis pela baixa estabilidade do ligante, mas sim uma soma de efeitos cumulativos. É observado no gráfico 8 que os demais resíduos também apresentam interações favoráveis para o sistema, porém em baixa escala energética, onde os resíduos Ser110, Leu153, Arg198 e Gly215 apresentaram energias abaixo de 1,5 Kcal/mol e os resíduos Ser86 e Ser87 mostraram  $E_{int}$  mais favoráveis de -2,317 Kcal/mol e -3,234 Kcal/mol.

**Gráfico 8** – Energias de interação ( $E_{int}$ , em Kcal/mol) entre os resíduos da 3MZE e o ligante cefotaxima



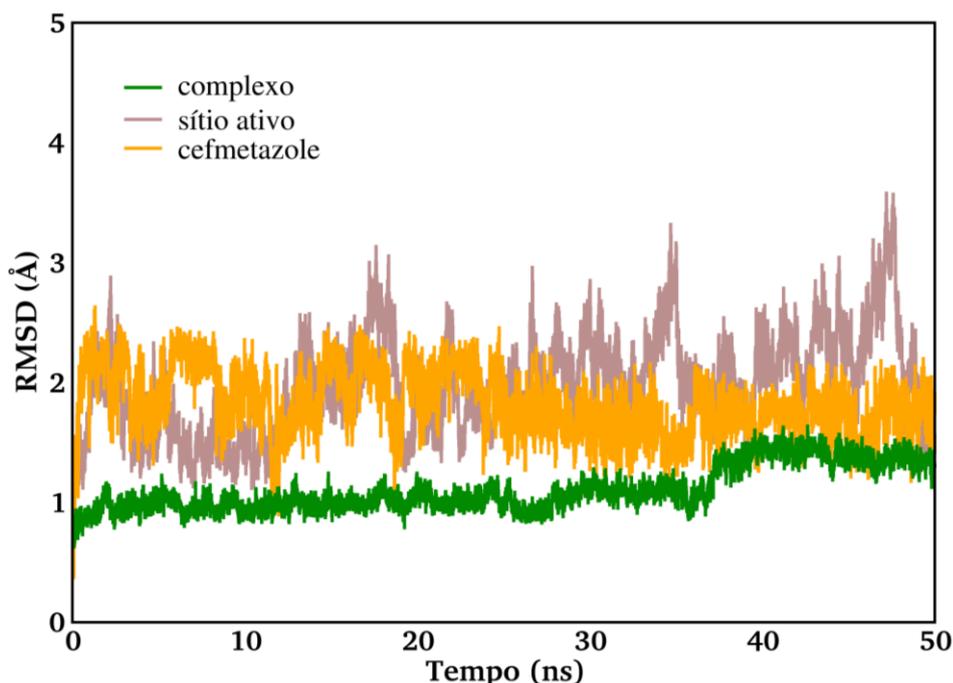
Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

Em contraste com as demais energias de interação deste sistema e confirmando o resultado obtido a partir do gráfico 6 de distâncias de interação, a  $E_{int}$  entre a Arg248 catalítica e o ligante cefotaxima, de -8,443 Kcal/mol, é bastante favorável, visto que está interação permanece com baixo valor de distância entre os átomos relacionados até o final da DM. O valor de  $\Delta G$  obtido pelo método de decomposição de energia para este sistema é de -15,577 Kcal/mol, que é um valor favorável de energia, mas que é influenciado mais fortemente apenas pelas energias de interação dos resíduos Ser86 e Ser87, que não exercem atividade catalítica direta com o ligante, bem como, e principalmente, pela energia de interação Arg248 catalítica, e mesmo assim, essas interações energeticamente mais fortes não foram suficientes para manter o complexo espontâneo entre a enzima e o ligante.

### 5.3.3 Ligante cefmetazole

De acordo com o RMSD do sistema formado pelo ligante cefmetazole, no gráfico 9, a trajetória do complexo se mantém bastante estável durante os 50 ns de simulação de DM, com variação de 1 Å. O sítio ativo também aparece no gráfico, com RMSD em torno de 2 Å a 2,5 Å, com alguns picos em 3,5 Å atribuídos pela flexibilidade das cadeias laterais dos aminoácidos consideradas nessa trajetória.

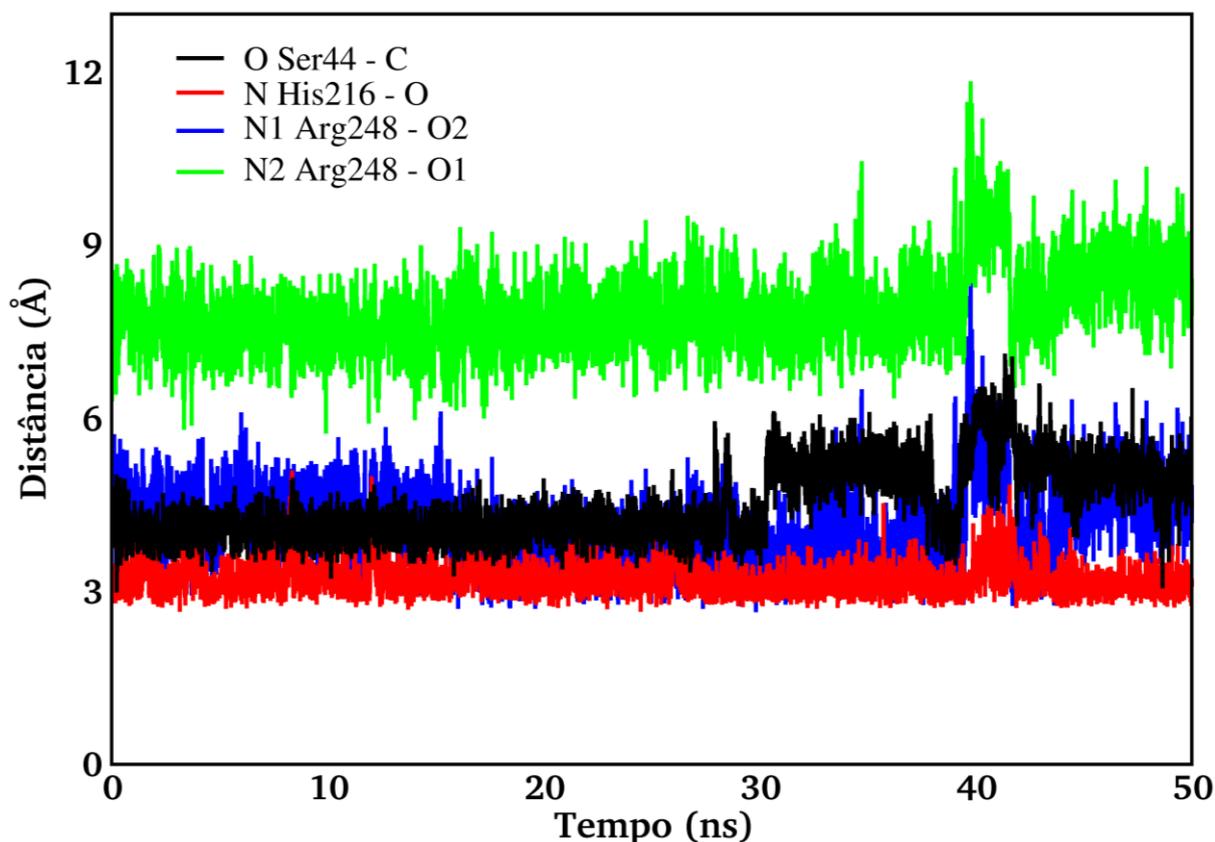
**Gráfico 9** – RMSD (em Å) do sistema 3MZE e o ligante cefmetazole *versus* o tempo de DM (em ns)



**Fonte:** dados extraídos desta pesquisa.

O comportamento do ligante cefmetazole mostrou-se com poucos desvios, no decorrer da DM, com variações entre 1,5 Å e 2,5 Å até 25 ns e RMSD abaixo de 2 Å até o final dos 50 ns de simulação, quando o ligante alcança a estabilidade. O gráfico das distâncias ao longo do tempo de simulação (Gráfico 10) reflete o comportamento geral do sistema.

**Gráfico 10** – Distâncias de interação (em Å) com a cefmetazole *versus* tempo de DM (em ns)



**Fonte:** dados extraídos desta pesquisa.

Embora haja estabilidade no sistema formado com o ligante cefmetazole, de acordo com a análise do gráfico e com as informações obtidas com os cálculos de distâncias médias, observa-se que as interações têm distâncias elevadas, mesmo não havendo significativos movimentos do complexo e do ligante. Esses valores de distâncias de interação podem ser vistos na tabela 3.

**Tabela 3** – Distâncias de interação (em Å) entre os resíduos catalíticos da 3MZE e o ligante cefmetazole

Interação	Intervalo	Distância média (Å)	Distância média total (Å)
<b>O Ser44 – C cefmetazole</b>	0 ns – 30 ns	4,1	4,5
	30 ns – 50 ns	5,13	
<b>N His216 – O cefmetazole</b>	0 ns – 50 ns	–	3,2
<b>N1 Arg248 – O2 cefmetazole</b>	0 ns – 50 ns	–	4,1
<b>N2 Arg248 – O1 cefmetazole</b>		–	7,84

Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

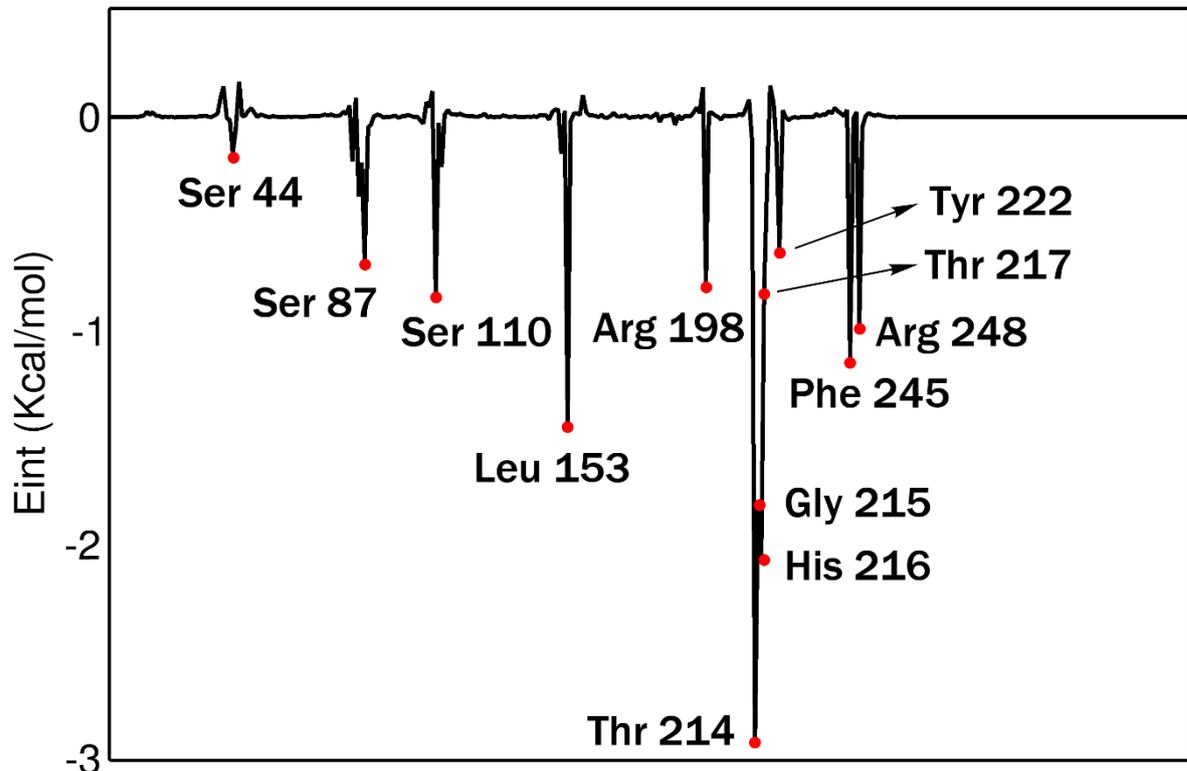
A Ser44 catalítica teve distância média de 4,1 Å até 30 ns, onde ocorre uma pequena variação que causou o aumento da distância de interação, ficando com média de 5,13 Å de distância entre os átomos relacionados até 50 ns de DM, concluindo com distância média total de 4,5 Å, não caracterizando a presença de uma forte interação com este resíduo catalítico.

Para a His216 catalítica a interação que ocorre entre o átomo de nitrogênio N da cadeia principal do resíduo e o átomo de oxigênio O da carbonila do anel  $\beta$ -lactâmico do ligante é totalmente estável durante todos os 50 ns de simulação, finalizando com distância média de 3,2 Å, aparentando descrever uma forte interação. Já para a Arg248 catalítica, a interação do átomo de nitrogênio N1 para o átomo de oxigênio O2 do ligante tem distância média de 4,1 Å, enquanto que do átomo de nitrogênio N2 do resíduo para o átomo de oxigênio O1 do ligante é de 7,84 Å, ambas mostram que não há interação estável com esse resíduo.

Portanto, pode ser observado na figura que o grupo carboxílico do ligante que faria as interações com a cadeia lateral do aminoácido catalítico Arg248 já inicia a DM com um largo distanciamento dessa interação, e chega aos 50 ns com distância muito próxima das distâncias iniciais.

No gráfico de decomposição para o sistema com o ligante cefmetazole (Gráfico 11), pode ser observado que as contribuições energéticas seguiram o mesmo padrão do gráfico 9 das distâncias de interação, pois mostra energias de interação pouco favoráveis para os resíduos catalíticos Ser44 e Arg248.

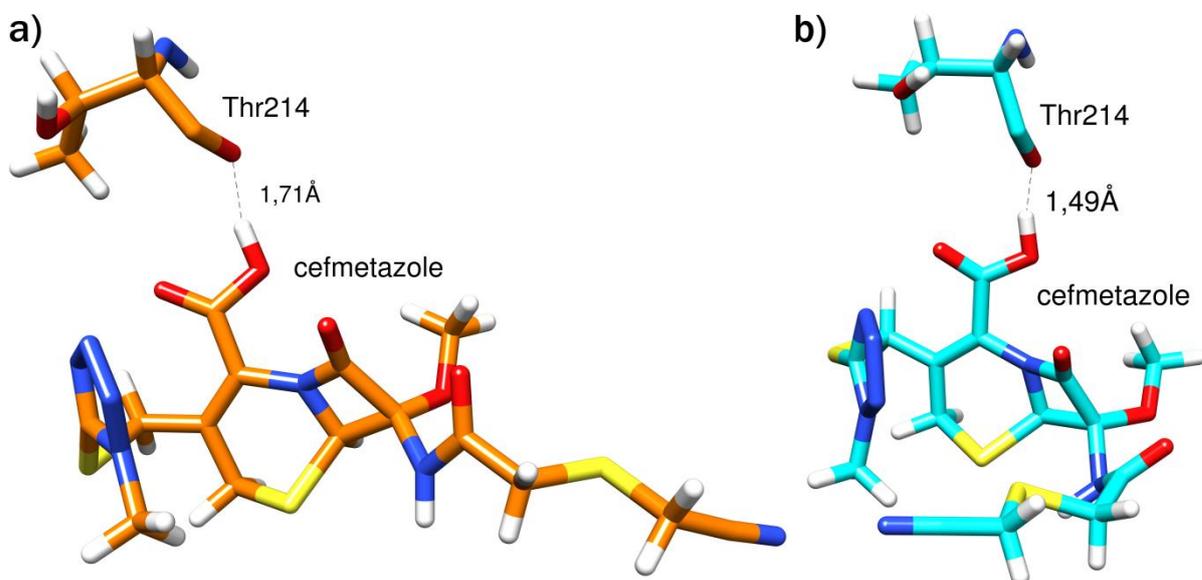
**Gráfico 11** – Energias de interação ( $E_{int}$ , em Kcal/mol) entre os resíduos da 3MZE e o ligante cefmetazole



**Fonte:** dados extraídos desta pesquisa.

As interações com os outros aminoácidos catalíticos, Ser44 e Arg248, são pouco favoráveis para as contribuições energéticas do sistema, com apenas -0,17 Kcal/mol e -0,97 Kcal/mol, respectivamente, essa baixa afinidade confirma os resultados apresentados através do gráfico 9 e dos altos valores de distâncias médias obtidos para estes dois resíduos catalíticos. A contribuição energética mais favorável está relacionada predominantemente ao resíduo Thr214, com  $E_{int}$  igual a -2,94 Kcal/mol, este resíduo se destaca, pois realizou forte ligação de hidrogênio entre o átomo de oxigênio O de sua cadeia principal com o átomo de hidrogênio H da hidroxila do grupo carboxílico ligado ao anel di-hidrotiazínico do ligante, durante os 50 ns de dinâmica molecular, apresentando valor de distância média de 1,94 Å. Na figura 17 podem ser observados dois pontos distintos da trajetória da DM, em 22 ns e em 40 ns, onde o ligante apresenta sua estrutura aberta e fechada, respectivamente, e a interação com o aminoácido Thr214 permanece bastante forte.

**Figura 17** – Interação entre o resíduo Thr214 e o ligante cefmetazole; a) ligante com estrutura aberta aos 22 ns (cor laranja) e estrutura fechada aos 40 ns (cor azul)



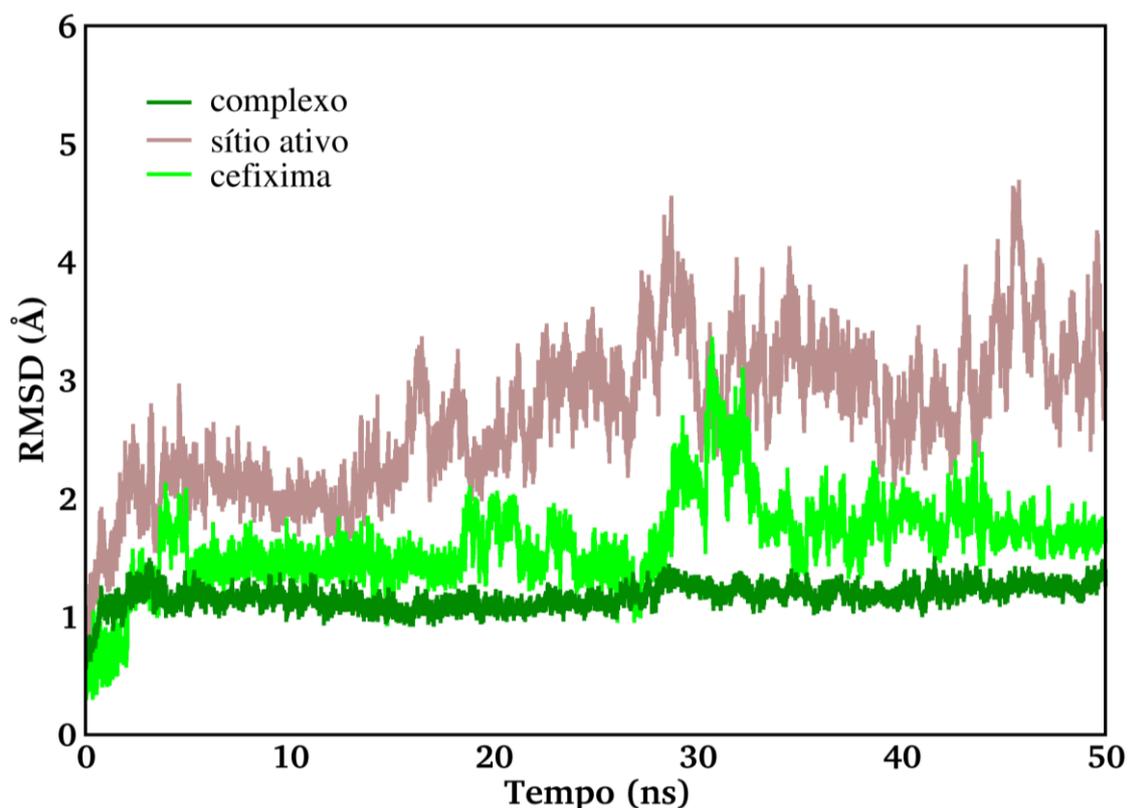
**Fonte:** dados extraídos desta pesquisa.

Segundo com os resíduos Leu 153 (-1,427 Kcal/mol), Gly215 (-1,804 Kcal/mol) e His216 catalítica (-2,061 Kcal/mol) que também apresentaram contribuições favoráveis. Os outros resíduos destacados também apresentam baixa escala de energias favoráveis, Ser87 (-0,67 Kcal/mol), Ser110 (-0,818 Kcal/mol), Arg198 (-0,776 Kcal/mol), Thr217 (-0,786 Kcal/mol), Tyr222 (-0,612 Kcal/mol) e Phe245 (-1,127 Kcal/mol). Essas contribuições energéticas influenciaram o valor de  $\Delta G$  deste sistema, que se mostrou favorável com -30,964 Kcal/mol, mas as baixas energias de interação com os resíduos do sítio ativo e sobretudo com o principal resíduo catalítico, Ser44, indicam que este ligante não formaria complexo espontâneo na inibição da proteína alvo de *E. coli*.

#### 5.3.4 Ligante cefixima

O sistema formado pela proteína 3MZE tem estabilidade quando interage com o ligante cefixima, como observado no gráfico 12, é formado complexo com RMSD de 1 Å. O sítio ativo tem variações de até 4,5 Å, mas que refletem as variações das cadeias laterais dos resíduos considerados, que detêm bastante flexibilidade.

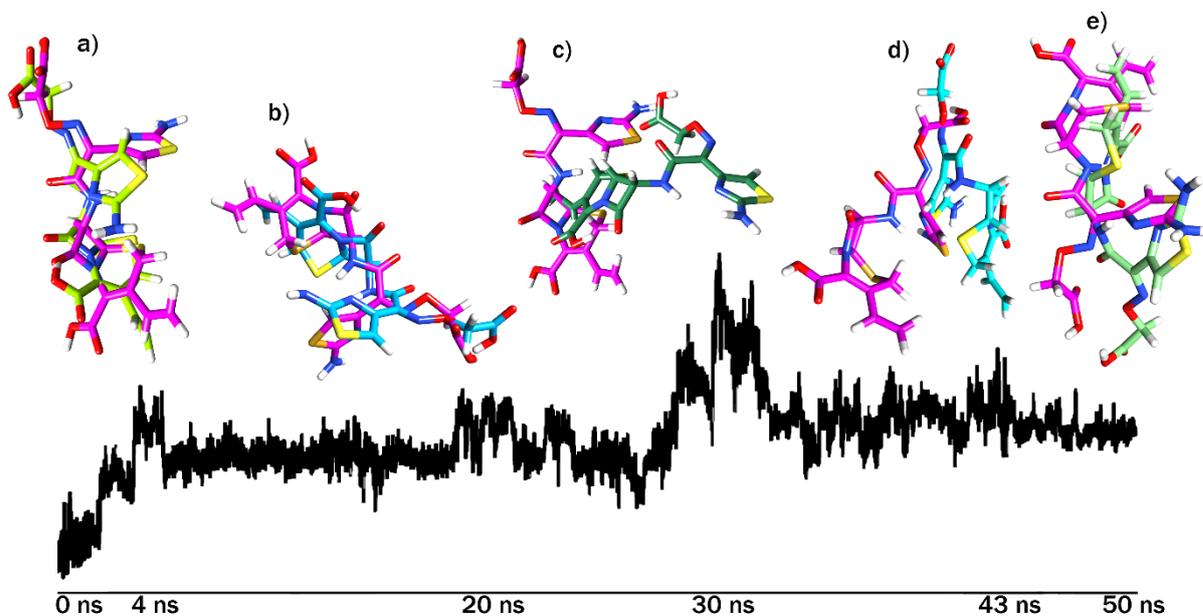
**Gráfico 12** – RMSD (em Å) do sistema 3MZE e o ligante cefixima *versus* o tempo de DM (em ns)



Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

A trajetória do ligante cefixima segue com poucas variações até 29 ns com RMSD entre 1,5 Å e 2 Å, a partir dos 29 ns até 33 ns o ligante apresenta um alta variação de 3,4 Å, devido ao grande grupo lateral que este ligante apresenta e que sofre mudanças conformacionais, como pode ser visto na figura 18, que exhibe a estrutura do ligante em diferentes pontos da DM.

**Figura 18** – Comparação da estrutura do ligante cefixima em diferentes momentos da dinâmica molecular; a) conformação do início da DM (cor rosa) e em 4 ns (cor verde claro); b) início da DM (cor rosa) e em 20 ns (cor azul); c) início da DM (cor rosa) e em 30 ns (cor verde escuro); d) início da DM (cor rosa) e em 43 ns (cor azul); e) início da DM (cor rosa) e em 50ns (cor verde)

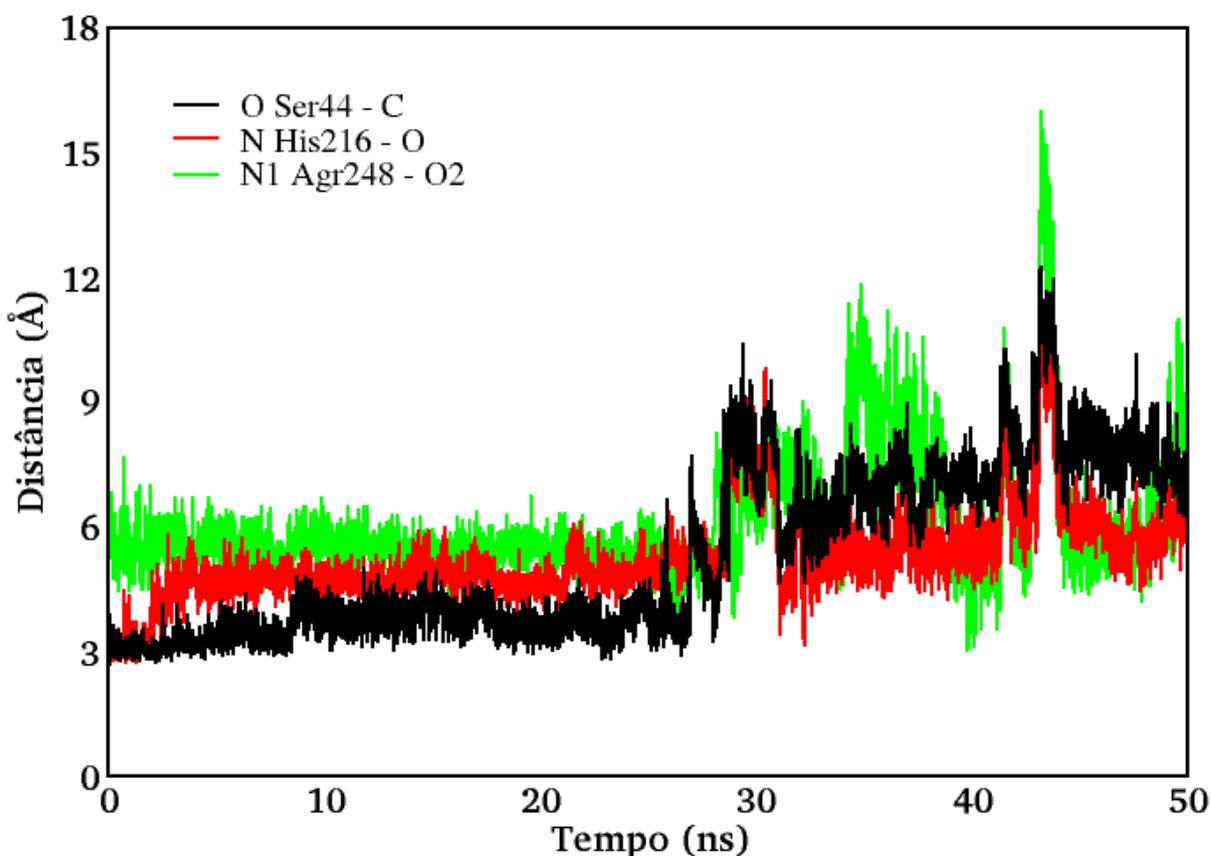


**Fonte:** dados extraídos desta pesquisa.

As variações observadas na trajetória do ligante cefixima, mostrada no gráfico 12 e mimetizada na figura 18, são devido às mudanças conformacionais sofridas pela ligante, visto que sua estrutura possui um longo radical substituinte no anel  $\beta$ -lactâmico que influenciou na sua grande movimentação. Em 4 ns e 20 ns já foi possível notar uma pequena movimentação de toda estrutura, em 30 ns e 43 ns a mudança conformacional e espacial foi bastante acentuada, pois toda estrutura da cefixima se distancia da posição e conformação inicial da DM, onde destaca-se os maiores picos de RMSD, de 3,4 Å e 2,5 Å, respectivamente, e em 50 ns o radical do anel  $\beta$ -lactâmico ainda está bastante distante da estrutura inicial.

Esse comportamento da estrutura do ligante refletiu nas interações com os resíduos catalíticos Ser44, His216 e Arg248, de acordo com o gráfico 13.

**Gráfico 13** – Distâncias de interação (em Å) com a cefixima *versus* tempo de DM (em ns)



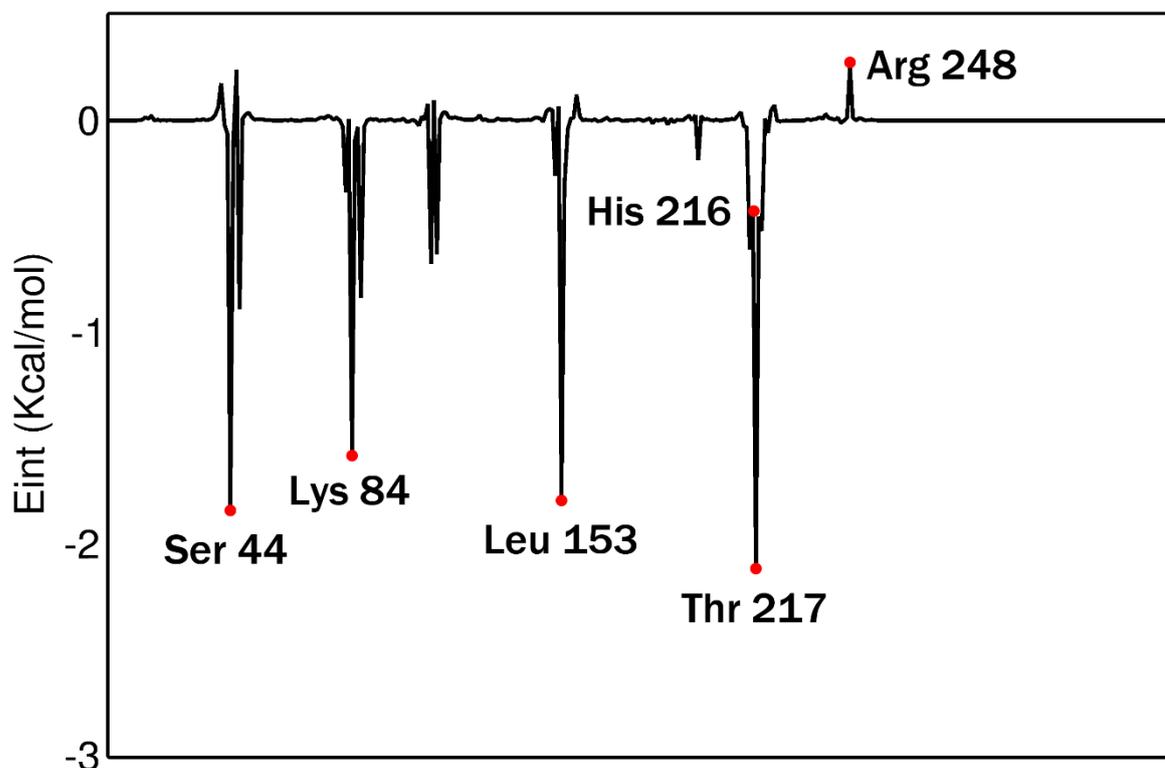
**Fonte:** dados extraídos desta pesquisa.

A interação com a Ser44 catalítica tem distância média de 3,63 Å até 27 ns, e após os 27 ns até os 50 ns de DM, a distância média é de 7,29 Å, portanto, percebe-se que o movimento aos 29 ns causou o distanciamento e a instabilidade da interação, finalizando com distância média total de 5,32 Å. Observando a interação com a His216 catalítica, a distância média é 4,7 Å até os 29 ns, de 5,99 Å até 50 ns e de 5,25 Å a distância média total, esses dados indicam que não houve interação estável entre o ligante cefixima e a His216 catalítica. Já para a Arg248 a distância média total é de 7,49 Å, mostrando que o ligante se distancia dos resíduos catalíticos e entre 29 ns e 50 ns não há interação estável entre eles e o ligante. Esse distanciamento e instabilidade são devido às grandes variações observadas na estrutura do ligante.

O gráfico 14 de decomposição do sistema com a cefixima confirmou os resultados obtidos pelo gráfico 13 de distâncias de interação, onde verificou-se que

as distâncias médias com os resíduos catalíticos foram bastante elevadas, assim, as energias de interação também apresentaram-se energeticamente pouco favoráveis.

**Gráfico 14** – Energias de interação ( $E_{int}$ , em Kcal/mol) entre os resíduos da 3MZE e o ligante cefixima



**Fonte:** dados extraídos desta pesquisa.

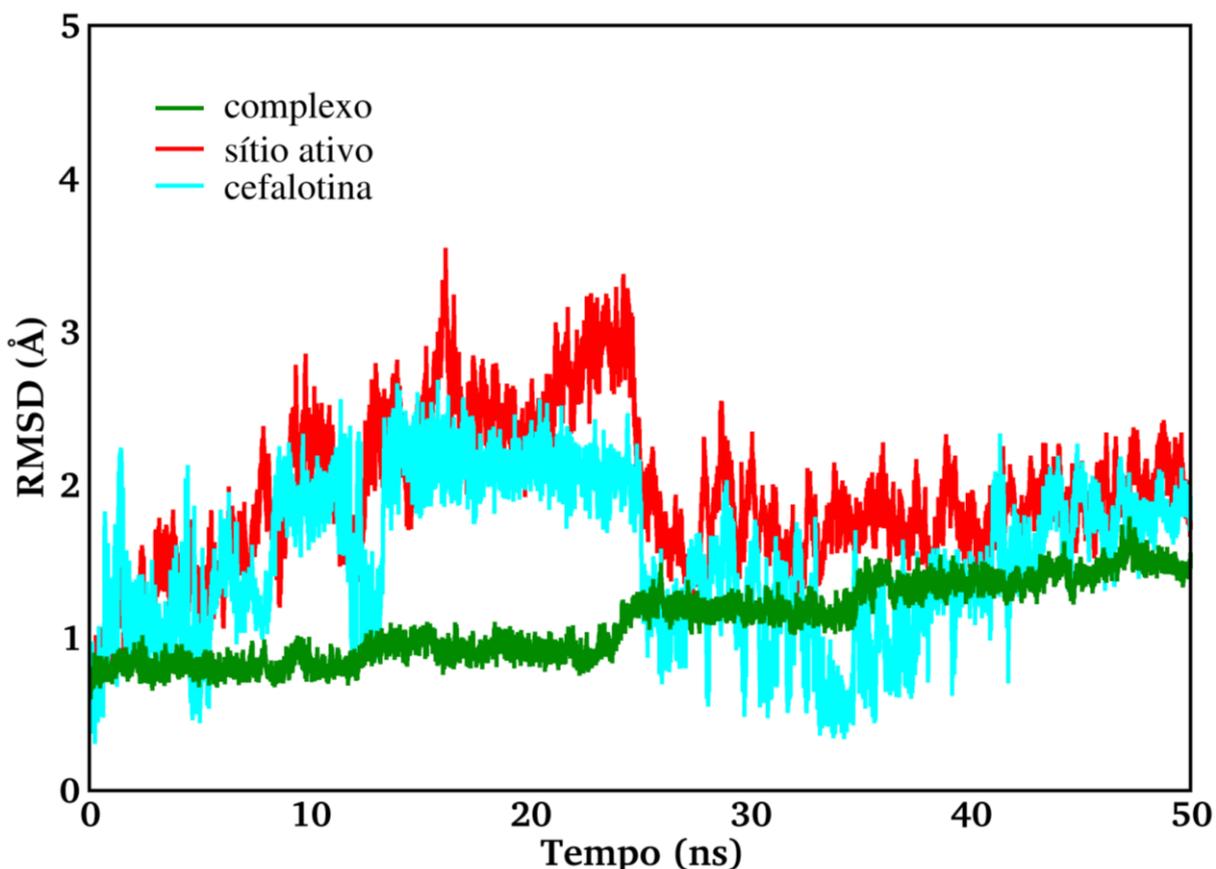
Como no caso do aminoácido catalítico His216, que não estabeleceu interação estável com o ligante durante os 50 ns de DM e apresentou baixíssima contribuição energética para o sistema, com  $E_{int}$  de -0,446 Kcal/mol e a Arg248 catalítica com 0,25 Kcal/mol, contribuindo com energia desfavorável para o complexo. A Ser44 catalítica tem melhor energia de interação, com -1,823 Kcal/mol, mas ainda assim, pouco contribui energeticamente, como foi observado na análise de interações, onde as distâncias médias não traduzem uma forte interação. A Lys84, Leu153 e a Thr217 que tem  $E_{int}$  de -1,564 Kcal/mol, -1,775 Kcal/mol e -2,096 Kcal/mol, respectivamente, que também apresentaram contribuições favoráveis. A energia livre de ligação obtida é favorável para o complexo, com  $\Delta G$  igual a -28,986 Kcal/mol, influenciada pelos valores de energias favoráveis, mas de acordo com as distancias médias entre os aminoácidos catalíticos e o ligante e as energias de interação entre eles, este sistema não demonstra ter potencial de formar interação

espontânea com a Ser44 catalítica, por exemplo, que exerce a função catalítica principal nesta enzima.

### 5.3.5 Ligante cefalotina

O gráfico 15 traz as trajetórias de RMSD do complexo, do sítio ativo de ligação e da estrutura do ligante cefalotina.

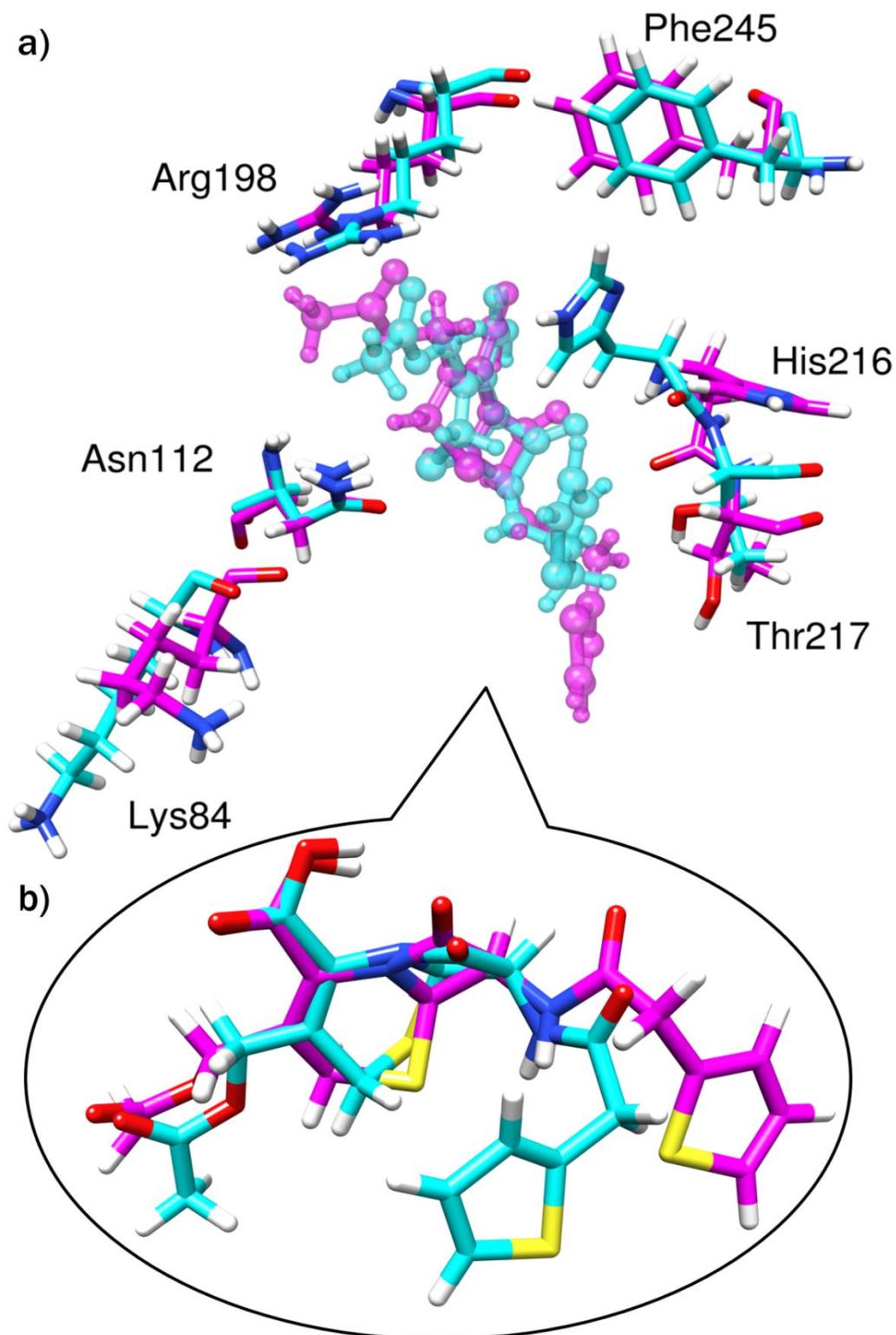
**Gráfico 15** – RMSD (em Å) do sistema 3MZE e o ligante cefalotina *versus* o tempo de DM (em ns)



**Fonte:** dados extraídos desta pesquisa.

A trajetória do complexo reflete um sistema sem grandes desvios, com RMSD abaixo de 1 Å até 24 ns e abaixo de 1,5 Å até os 50 ns de simulação, indicando ser um sistema bastante estável. O sítio ativo apresenta um comportamento que se assemelha ao do ligante, onde em aproximadamente 25 ns ambas as trajetórias sofrem uma mudança que diminui o valor de RMSD, que progredia de 1 Å a 2 Å até 10 ns e de 2 Å a 3 Å até 25 ns, mas que após os 25 ns os desvios ficaram abaixo de 2 Å. Essa mudança observada para o sítio ativo e para cefalotina são mostradas na figura 19.

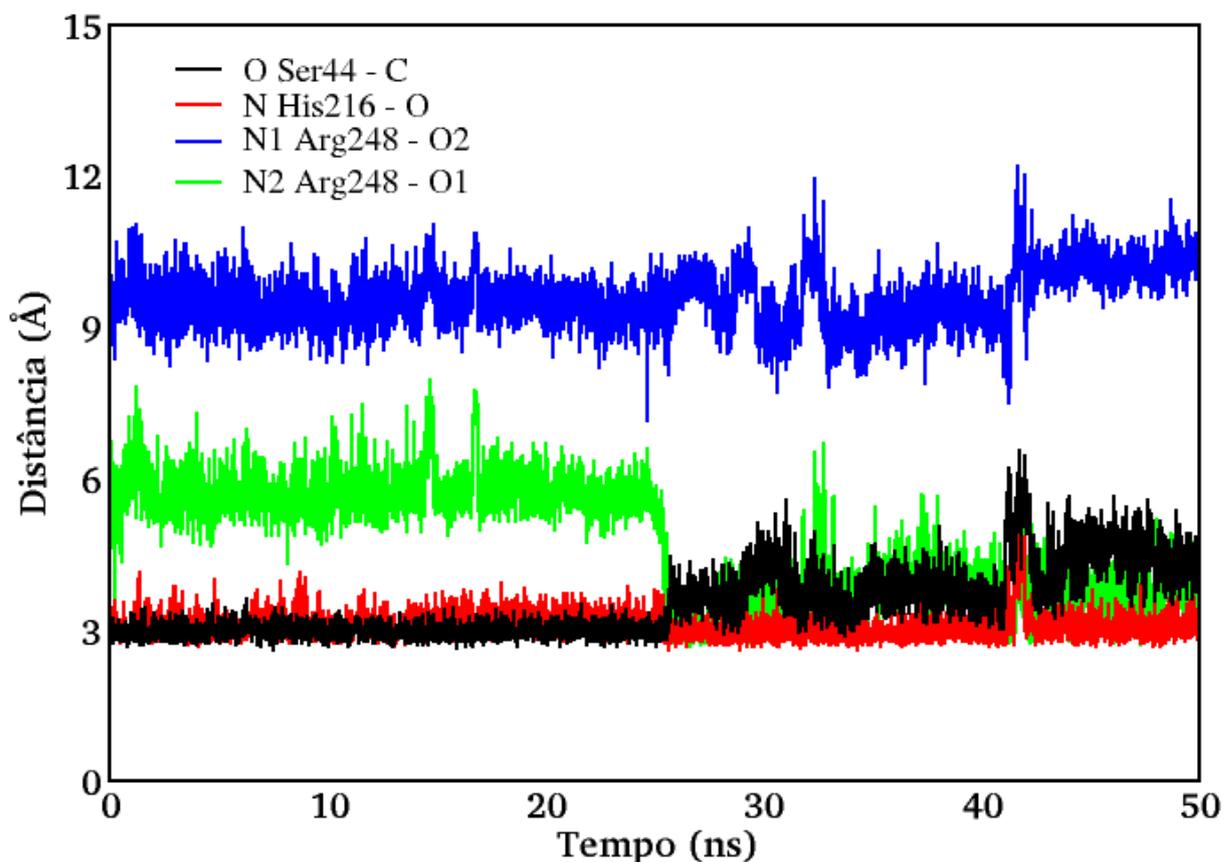
**Figura 19** – Mudança conformacional ocorrida em aproximadamente 25 ns de DM; (a) estrutura dos resíduos do sítio ativo de ligação antes (cor azul) e depois (cor rosa) da mudança conformacional; (b) estrutura do ligante cefalotina antes (cor azul) e depois (cor rosa) da mudança conformacional



Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

Na figura anterior as estruturas com coloração azul, para os átomos de carbono, representam as conformações no momento anterior à mudança, e com coloração rosa representa as conformações após a mudança, ou seja, quando o RMSD sofre a queda. É possível visualizar na figura 19a que alguns resíduos destacados do sítio ativo sofreram mudanças conformacionais de pequena escala, que é o caso da Asn112 e de outros resíduos que não mostraram mudanças significativas, mas também houveram mudanças conformacionais e espaciais de maior escala, como observado para os resíduos Lys84, Arg198, His216 e Thr217, que apresentaram rotação de suas cadeia laterais, e a Phe245, que apenas se moveu levemente no espaço. Essas variações conformacionais observadas para os resíduos causaram a estabilização do sítio, com baixo valor RMSD após o momento destacado. Para a figura 19b observa-se que a estrutura da cefalotina se mantinha fechada, estrutura com carbonos de cor azul, enquanto progredia a dinâmica, ou seja, até os 25 ns de simulação ela estava com sua conformação mais contorcida, e que após o instante apontado no gráfico de RMSD o ligante passou para a conformação mais aberta, estrutura com carbonos de cor rosa, e permaneceu assim até o final da DM. Essa mudança, que foi nitidamente observada na trajetória de RMSD do ligante, influenciou sua maior estabilidade, mantendo a variação média em 1,35 Å, mas alterou as interações com resíduos catalíticos, o gráfico 16 mostra essas variações nas distâncias de interação.

**Gráfico 16** – Distâncias de interação (em Å) com a cefalotina *versus* tempo de DM (em ns)



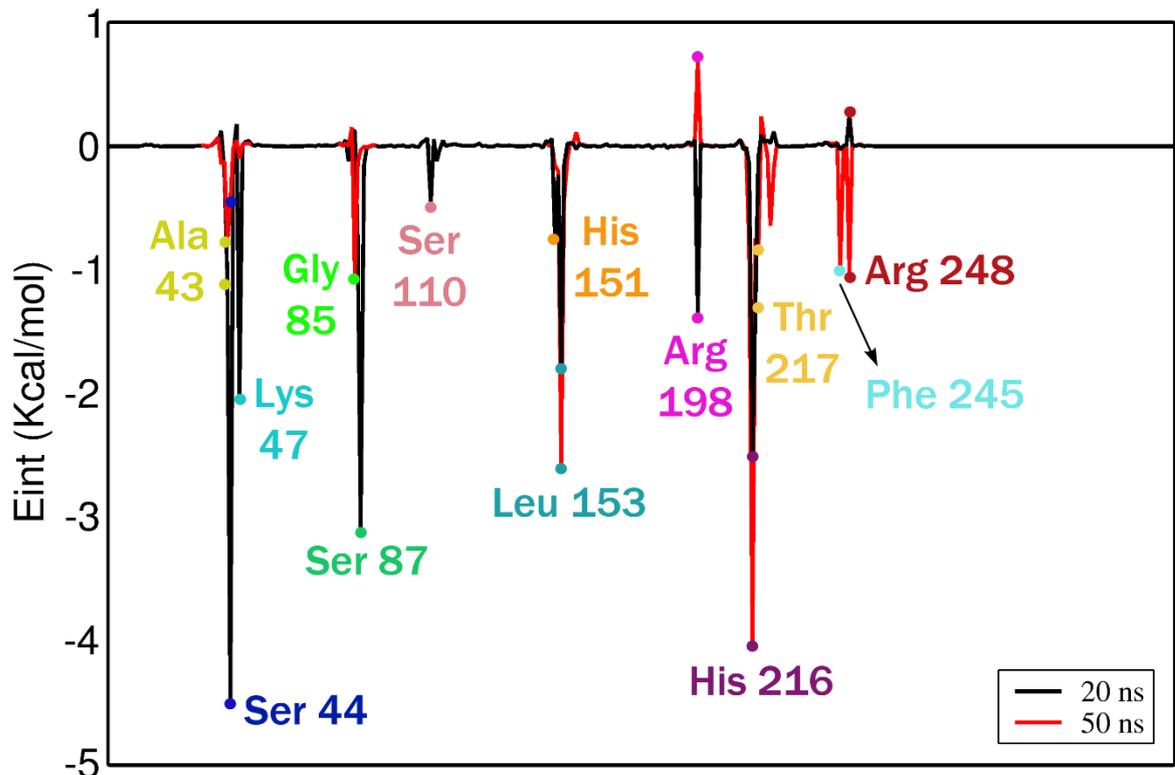
**Fonte:** dados extraídos desta pesquisa.

Com base neste gráfico conclui-se que a conformação fechada do ligante, embora apresentasse valores de RMSD em 2,5 Å, foi a conformação que mais estabeleceu interações estáveis com os resíduos catalíticos. Analisando a trajetória referente à interação da Ser44 catalítica com o ligante, até 25 ns de DM a distância média de interação era de 2,97 Å, indicando uma forte interação do átomo de oxigênio O do resíduo para com o átomo de carbono C do grupo carbonílico do anel  $\beta$ -lactâmico do ligante. Após a mudança conformacional do ligante a distância média de interação até os 50 ns passou a ser de 3,99 Å, portanto houve um pequeno afastamento dos grupos que interagem, a distância média total neste caso é de 3,48 Å. O átomo de nitrogênio N1 da Arg248 catalítica e o átomo de oxigênio O2 do grupo carboxílico do anel di-hidrotiazínico do ligante não estabeleceram interação estável durante os 50 ns de dinâmica molecular, com distância média de 9,56 Å, e o átomo de nitrogênio N2 deste resíduo para o átomo de oxigênio O1 do mesmo grupo do ligante não mantinham interação até os 25 ns de DM, com distância média de 5,71

Å, mas após os 25 ns a distância média passa a ser de 3,76 Å, portanto houve uma aproximação deste átomo da Arg248 para o ligante, o que pode indicar uma forte interação sendo formada. A interação com o aminoácido His216 catalítica não foi afetada aos 25 ns de DM, como aconteceu com a Ser44 e Arg248, a interação que ocorre entre o átomo de nitrogênio N da cadeia principal da His216 com o átomo de oxigênio O da carbonila do anel  $\beta$ -lactâmico do ligante tem distância média de 3,08 Å, bastante forte ao longo de toda DM. Conclui-se que este intervalo até 25 ns de simulação do sistema com a cefalotina possui elevada estabilidade e grande possibilidade de haver a formação da ligação covalente entre o átomo de C $\alpha$  da carbonila do anel  $\beta$ -lactâmico e o átomo de oxigênio O do resíduo catalítico Ser44, e mesmo as variações da trajetória do ligante, até 2,5 Å nesse intervalo, não desestabilizaram nem o complexo e nem as interações estabelecidas.

Para obter as informações detalhadas das contribuições dos resíduos para o sistema formado pelo ligante cefalotina, foram analisados dois intervalos distintos durante a DM, devido ao que foi observado nos gráficos 15 e 16, de RMSD e distâncias de interação, respectivamente, onde houve a mudança do comportamento do ligante e do sítio ativo aos 25 ns de simulação de DM, que promoveram o distanciamento do ligante em relação ao resíduo catalítico Ser44 e aproximação em relação ao resíduo catalítico Arg248. Portanto, o gráfico 17 representa os intervalos em 20 ns, na linha de cor preta, e 50 ns, na cor vermelha, demonstrando as variações nos efeitos de interação e energéticos impulsionados pela mudança conformacional.

**Gráfico 17** – Energias de interação ( $E_{int}$ , em Kcal/mol) entre os resíduos da 3MZE e o ligante cefalotina



**Fonte:** dados extraídos desta pesquisa.

Compreende-se a partir deste gráfico, e além das análises dos gráficos 14 e 15, que o ligante cefalotina e o aminoácido catalítico Ser44 tiveram interação energeticamente muito favorável até os 25 ns de simulação, com energia de interação igual a -4,489 Kcal/mol, representado no gráfico pelo intervalo em 20 ns. Mas quando comparada a  $E_{int}$  dessa mesma interação no intervalo em 50 ns de DM, que é de -0,458 Kcal/mol, nota-se a forte diminuição da contribuição energética favorável desse resíduo no sistema. Também foi possível avaliar a variação do efeito energético da interação com o aminoácido catalítico Arg248, que aos 20 ns tem  $E_{int}$  igual a 0,249 Kcal/mol, com contribuição desfavorável para o sistema, e aos 50 ns o valor da  $E_{int}$  eleva-se para -1,029 Kcal/mol, mostrando formar interação com contribuição energeticamente mais favorável. Esses dados confirmam as análises anteriores do gráfico 15, em relação às interações com a Ser44 e Arg248 catalíticas, uma vez que houve enfraquecimento da interação com a Ser44 catalítica após os 25 ns e também o breve fortalecimento da interação com a Arg248 catalítica. A interação com a His216 catalítica também sofreu variações, mais ao contrário do

perfil observado para o resíduo Ser44 catalítico, a  $E_{int}$  com a His216 catalítica se tornou mais favorável durante a evolução da DM. Os valores de energia relacionados às interações analisadas podem ser consultados na tabela 4.

**Tabela 4** – Energias de interação por resíduo (em Kcal/mol) e  $\Delta G$  do sistema formado pelo ligante cefalotina

Intervalo (ns)	Energia por resíduo (Kcal/mol)			$\Delta G$ (Kcal/mol)
	Ser44	His216	Arg248	
20	-4,489	-2,488	0,249	-34,225
40	-1,383	-4,27	-1,249	-27,243
45	-0,742	-3,79	-1,449	-24,467
50	-0,458	-4,019	-1,029	-27,722

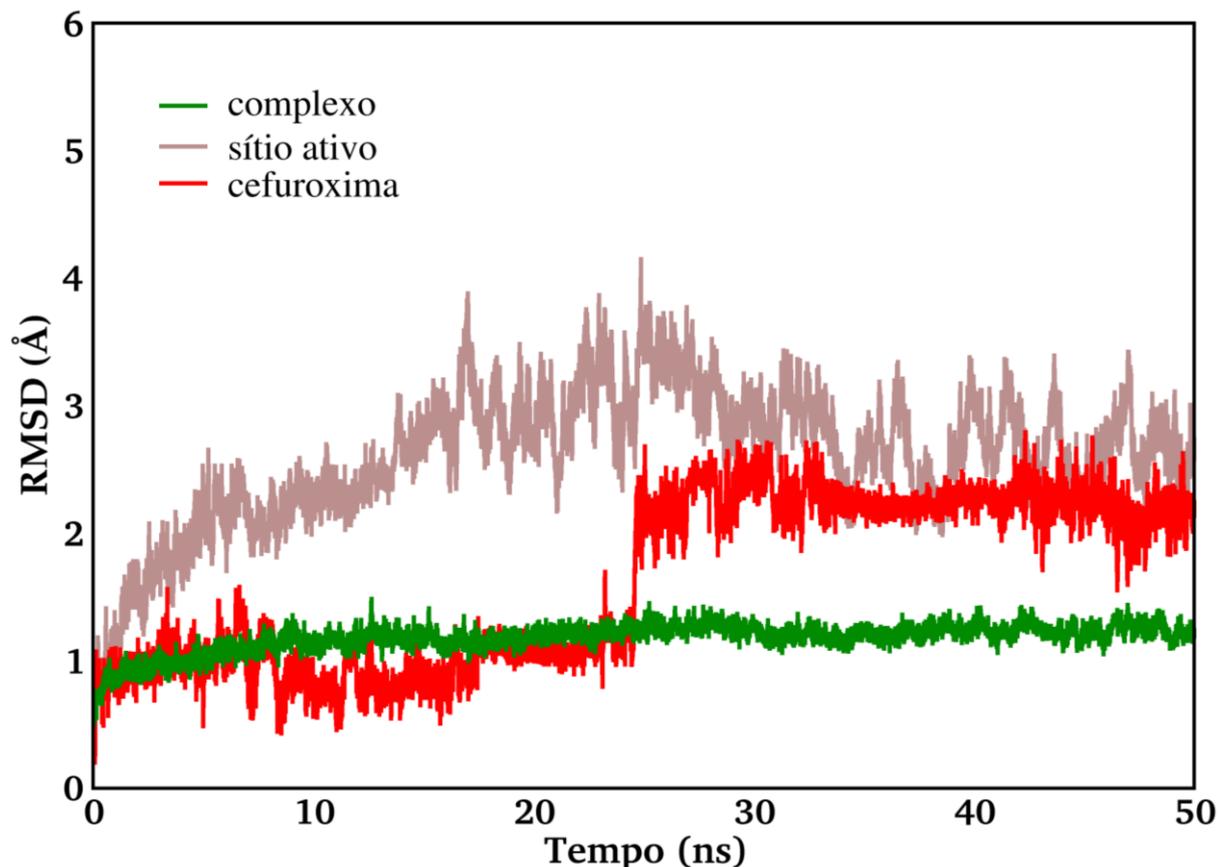
**Fonte:** dados extraídos desta pesquisa.

O valor de  $\Delta G$  de -34,225 Kcal/mol relacionado ao intervalo de 20ns de simulação é o mais favorável dentre os valores de  $\Delta G$  dos outros momentos da DM apresentados na tabela, devido à maior  $E_{int}$  do ligante cefalotina com os resíduos catalíticos Ser44 e His216, e também é o sistema energeticamente mais espontâneo e favorável dentre todos os outros sistemas já apresentados, ou seja, combinando esse valor às excelentes energias de interação com os resíduos catalíticos Ser44 e His216, o complexo formado entre a PBP5 e o ligante cefalotina indica apresentar o caráter mais espontâneo dos sistemas formados.

### 5.3.6 Ligante cefuroxima

O gráfico 18 apresenta o RMSD gerado para o sistema formado entre o ligante cefuroxima e a proteína 3MZE.

**Gráfico 18** – RMSD (em Å) do sistema 3MZE e o ligante cefuroxima *versus* o tempo de DM (em ns)

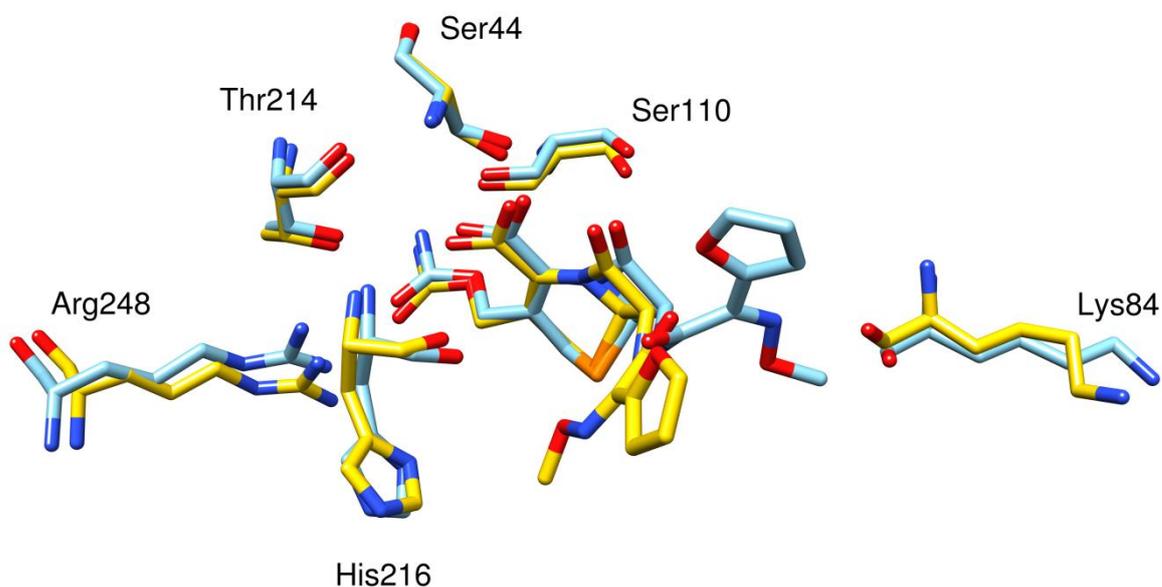


**Fonte:** dados extraídos desta pesquisa.

A trajetória referente ao comportamento do complexo receptor-ligante se manteve bastante estável durante toda a simulação de DM, com variação média de 1 Å. O sítio ativo também apresenta caráter de estabilidade, sem grandes desvios. A trajetória que representa o ligante cefuroxima, em vermelho, segue com muita estabilidade durante toda a DM, com RMSD médio de 0,96 Å até aproximadamente 25 ns, onde é possível observar a ocorrência de uma elevação instantânea dessa trajetória, que segue com esse comportamento até o final da DM com bastante estabilidade, apresentando RMSD médio de 2,25 Å no intervalo de 25 ns a 50 ns. Essa elevação da trajetória é decorrente de uma mudança conformacional sofrida pela estrutura do ligante, que contém grandes radicais substituintes ligados ao núcleo cefalosporínico e esses radicais possuem graus de liberdade que permitem a

rotação de algumas ligações, possibilitando a ocorrência da mudança conformacional observada. A figura 20 apresenta a estrutura do ligante e dos aminoácidos do sítio ativo nas conformações assumidas no momento imediatamente antes e depois da mudança destacada próxima dos 25 ns, permitindo compreender o que ocorre dentro do complexo.

**Figura 20** – Estrutura dos resíduos do sítio ativo e do ligante cefuroxima antes da mudança conformacional (cor azul) e após a mudança conformacional (cor amarela) aos 25 ns

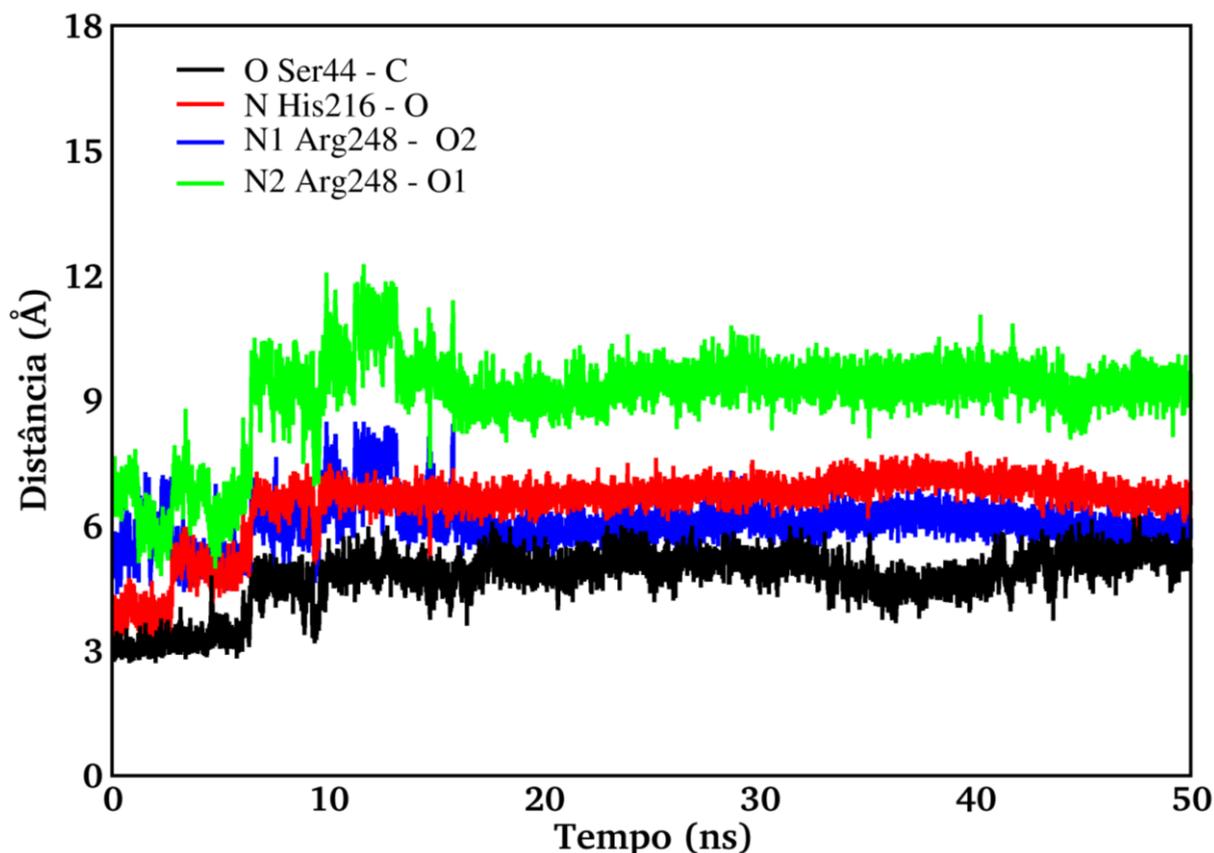


**Fonte:** dados extraídos desta pesquisa.

Observa-se que a estrutura do ligante que contém os carbonos de cor azul, o radical ligado ao anel  $\beta$ -lactâmico está voltado para cima, próximo do resíduo Lys84 possivelmente estabelecendo alguma interação que o mantinha nessa conformação, antes de sofrer a mudança conformacional, e quando comparado com a segunda estrutura, que tem os carbonos em cor amarelo, nota-se que o mesmo radical aparece voltado para baixo, enquanto que o restante da estrutura se conserva, assumindo uma conformação mais fechada do que a anterior, mantendo-se assim até o final da DM, com poucas variações, é nesse momento que acontece o pico de RMSD aos 25 ns na trajetória do ligante, que permanece até os 50 ns. Na figura é possível sugerir que antes da mudança conformacional havia uma interação acontecendo entre o ligante e o átomo de oxigênio da cadeia principal do resíduo Lys84, mas a possível perda dessa interação, deixando o radical mais livre, pode ter causado a mudança na conformação do ligante.

Como podem ser analisadas no gráfico 19, as interações com os principais resíduos catalíticos apresentam distâncias elevadas.

**Gráfico 19** – Distâncias de interação (em Å) com a cefuroxima *versus* tempo de DM (em ns)

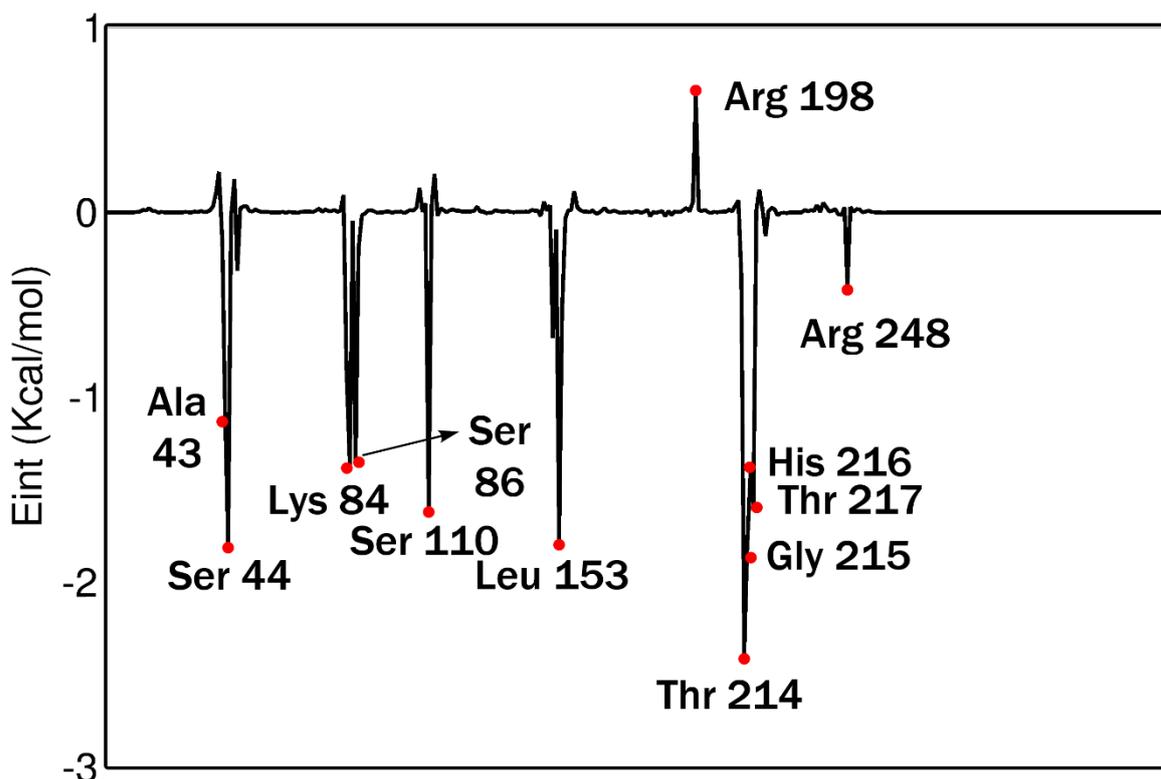


**Fonte:** dados extraídos desta pesquisa.

O resíduo catalítico Arg248 não mantém interação estável com o ligante, de acordo com as distâncias médias, onde do átomo de nitrogênio N1 do resíduo para o átomo de oxigênio O2 do ligante é de 6,06 Å e do átomo de nitrogênio N2 da Arg248 para o átomo de oxigênio O1 do ligante a distância média é de 9,07 Å. O aminoácido catalítico His216 também apresenta alta distância média de interação com ligante, com 6,51 Å. A Ser44 catalítica inicia a DM apresentando baixa distância média de interação com o ligante, 3,2 Å até os 6 ns de DM, mas a partir dos 6 ns a distância de interação sobe e a média fica em 4,9 Å. Portanto, as distâncias médias indicam que não houve fortes interações estáveis entre o ligante e os resíduos catalíticos da enzima.

Por fim, o gráfico de decomposição de energia por resíduos (Gráfico 20) para o sistema formado com o ligante cefuroxima foi gerado e analisado, e confirma os dados relacionados às distâncias de interação quando comparadas com a energia.

**Gráfico 20** – Energias de interação ( $E_{int}$ , em Kcal/mol) entre os resíduos da 3MZE e o ligante cefuroxima



Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

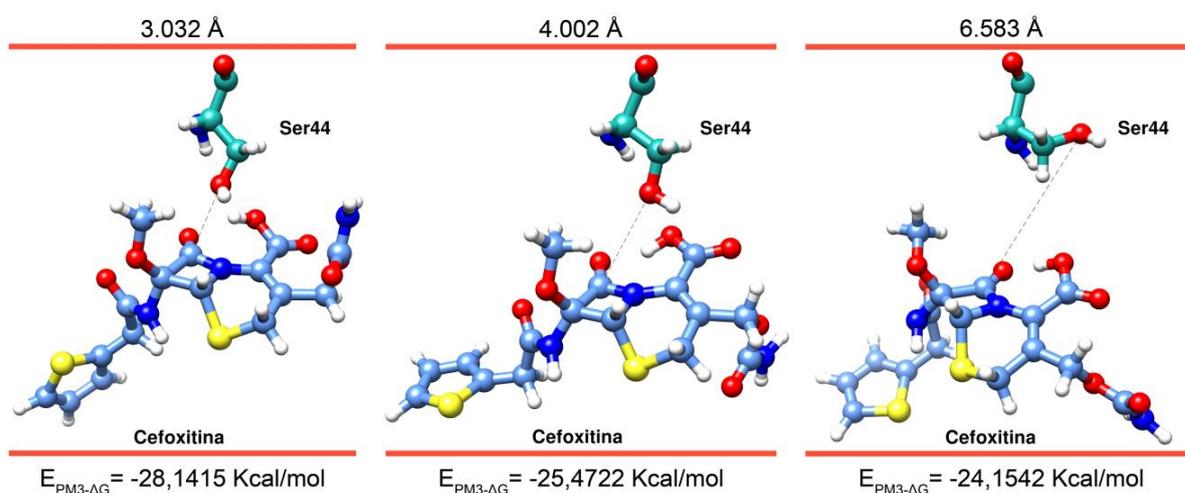
O resultado observado no gráfico 18 de distâncias de interação, combinado com os valores das distâncias médias de interação com o resíduo catalítico Arg248, está de acordo com o que se observa no gráfico 19 de decomposição, onde a  $E_{int}$  é de apenas -0,405 Kcal/mol, ou seja, a Arg248 catalítica não exerce contribuição energética significativa para o sistema formado entre a proteína e o ligante cefuroxima. A His216 catalítica também apresentou alta distância média de interação com o ligante, e de acordo com o resultado da decomposição, essa interação realmente não exerce grande influência energética, com apenas -1,398 Kcal/mol, valor influenciado pelos primeiros ns de simulação de dinâmica molecular, onde as distâncias entre o ligante e a His216 catalítica eram mais baixas. Para o aminoácido catalítico Ser44, o valor de energia de interação apresentou uma ligeira melhora em relação aos outros resíduos catalíticos, visto que a  $E_{int}$  é igual a -1,787

Kcal/mol, também influenciado pelos primeiros ns da DM, mas ainda não tem elevada contribuição energética favorável para o sistema, concordando com o resultado das distâncias médias, onde o ligante mostrou-se pouco atraído pela Ser44 catalítica. Outros resíduos foram destacados no resultado de decomposição, como a Thr214 que teve a maior contribuição energética favorável para este sistema com  $E_{int}$  igual a -2,388 Kcal/mol e a Arg198, que demonstrou energia desfavorável, com 0,633 Kcal/mol. Os demais resíduos apresentados também apresentam baixa escala de energias favoráveis, como a Ala43 (-1,114 Kcal/mol), a Lys84 (-1,367 Kcal/mol), Ser86 (-1,341 Kcal/mol), Ser110 (-1,593 Kcal/mol), Leu153 (-1,771 Kcal/mol), Gly215 (-1,810 Kcal/mol) e Tyr217 (-1,582 Kcal/mol). Essas poucas energias de interação garantiram que este sistema tivesse  $\Delta G$  favorável igual a -35,0851 Kcal/mol.

#### 5.4 MM/GBSA e QMMM/GBSA

O estudo da interação entre o átomo de oxigênio da cadeia lateral do resíduo catalítico Ser44 e o átomo de carbono carbonílico do anel  $\beta$ -lactâmico do ligante permite a melhor compreensão dos efeitos físico-químicos dessa interação, bem como sua contribuição para o sistema. A figura 21 ilustra a interação entre a Ser44 catalítica e o ligante cristalográfico cefoxitina em três diferentes momentos da dinâmica molecular, variando a distância de interações entre os átomos citados.

**Figura 21** – Energia QMMMGBSA para a interação entre a Ser44 catalítica e o ligante cristalográfico cefoxitina



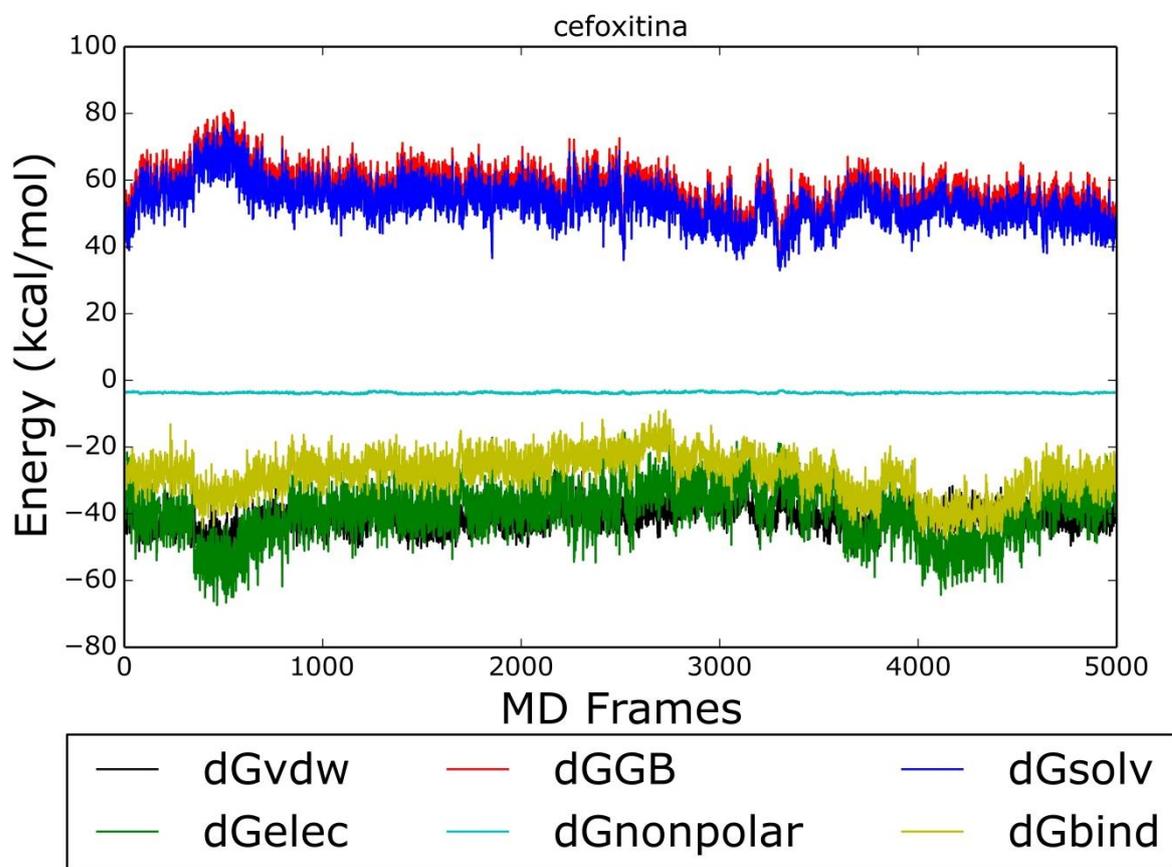
Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

No primeiro momento destacado a distância de interação era de 3,032 Å, e a energia obtida pelo método PM3,  $E_{PM3-\Delta G}$  igual a -28,1415 Kcal/mol, demonstrou que a forte interação entre a Ser44 catalítica e o ligante permite que o sistema apresente energia livre de ligação altamente favorável, como a que foi obtida. Já no segundo momento, quando a interação já está enfraquecida e a distância entre os átomos é de 4,002 Å, a  $E_{PM3-\Delta G}$  sofre uma acentuada diminuição para -25,4722 Kcal/mol. E no terceiro momento, quando a distância de interação entre a Ser44 catalítica e o ligante já está em 6,583 Å, a energia livre de ligação apresenta-se com valor mais alto, com  $E_{PM3-\Delta G}$  de -24,1542 Kcal/mol, demonstrando que o distanciamento entre o ligante e o principal resíduo catalítico, Ser44, influencia na espontaneidade do sistema, obtendo, junto com o aumento gradativo da distância de interação, um sistema menos favorável energeticamente. Então, os sistemas em que o ligante não mantém interação estável com o aminoácido catalítico Ser44, que exerce a função catalítica principal na enzima PBP5 de *E. coli*, mostram-se menos espontâneos, com energias de livres de ligação menos favoráveis.

Portanto, a energia livre de ligação obtida pelo método de QMMMGBSA comprovou que a interação com o aminoácido catalítico Ser44 é muito importante para o sistema, e forneceu parâmetros para comparar os valores de energias dos outros sistemas, visto que o afastamento deste resíduo influencia na energia livre de ligação do sistema, aumentando o valor da energia, ou seja, o sistema torna-se menos favorável para formação do complexo. Entretanto, as outras interações existentes entre os ligantes e os demais resíduos do sítio ativo de ligação, estabelecidas durante as simulações de DM, permitem que o  $\Delta G$  do sistema seja favorável, mesmo que em menor escala energética, visto que essas interações mantêm a formação o complexo.

A progressão energética do sistema formado entre a proteína e o ligante cristalográfico cefoxitina foi observada através do gráfico 21, que descreve as variações de energia livre de ligação durante o 50 ns de produção de dinâmica molecular.

**Gráfico 21** – Energia Livre de Ligação *versus* tempo de DM (em frames, 50 ns) do sistema com o ligante cefoxitina

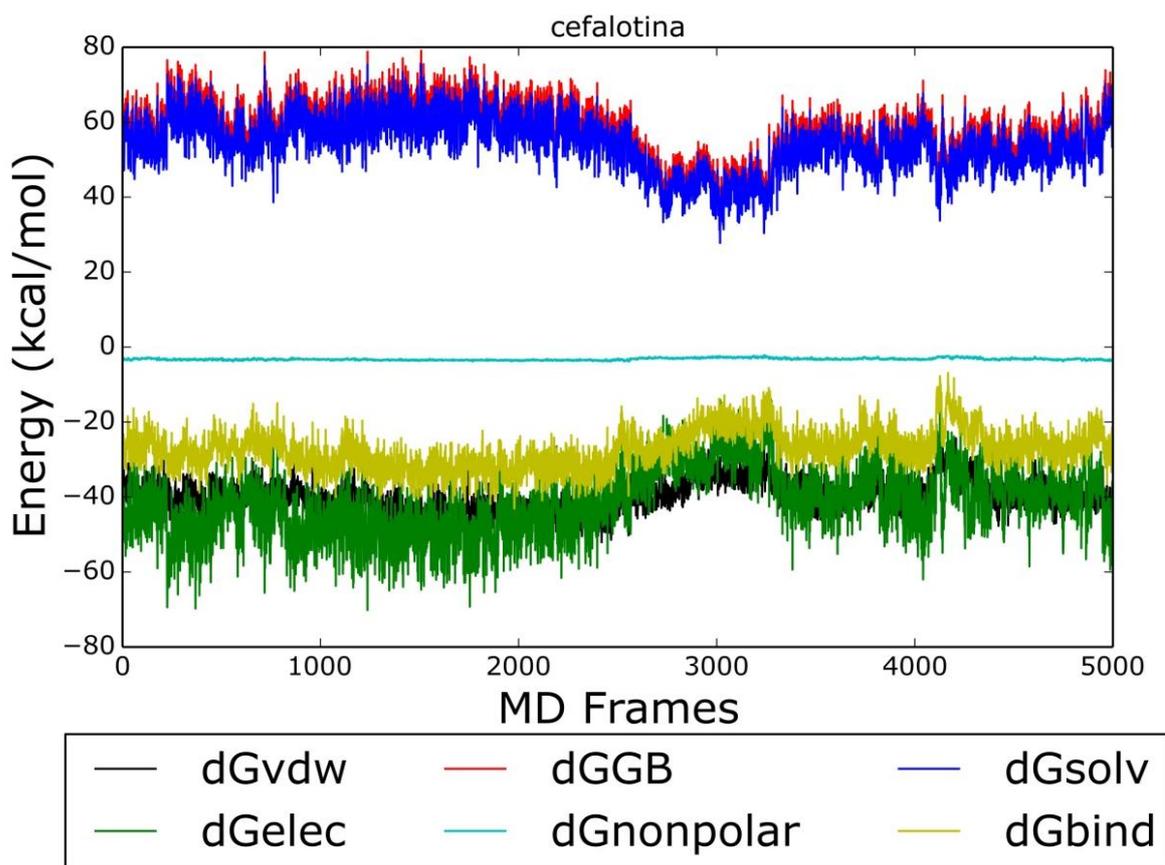


Fonte: dados extraídos desta pesquisa.

É possível observar que as energias de van der Waals ( $\Delta G_{vdw}$ , em preto) e eletrostática ( $\Delta G_{elec}$ , em verde) mostraram algumas variações durante a simulação, mas são favoráveis para o sistema, indicando que as interações eletrostáticas, com  $\Delta G_{elec}$  igual a -39,821 Kcal/mol e as interações de hidrogênio, com  $\Delta G_{vdw}$  igual a -41.599 Kcal/mol, contribuem fortemente para o sistema na formação do complexo estável. A energia livre de ligação ( $\Delta G_{bind}$ ) também mostrou variações, que podem ser explicadas pelo próprio comportamento do sistema analisado pelo gráfico de RMSD, a energia média relacionada ao  $\Delta G_{bind}$  é de -28,225 Kcal/mol, bastante favorável e bem próxima das energias obtidas pelos métodos de MM/GBSA combinado ao cálculo de decomposição, com  $\Delta G$  de -31,471 Kcal/mol, e PM3, com  $E_{PM3-\Delta G}$  de -28,1415 Kcal/mol, confirmando que o complexo com a cefoxitina é energeticamente favorável, mas devido às interações estabelecidas entre o ligante e outros resíduos do sítio ativo, que mantiveram o ligante na cavidade catalítica, visto que as interações com os aminoácidos catalíticos são bastante fracas.

O gráfico das variações de energia livre de ligação durante a simulação (Gráfico 22) também foi gerado para o sistema do ligante cefalotina e assim obteve-se um valor de  $\Delta G$  médio, que representa os 50 ns de DM.

**Gráfico 22** – Energia Livre de Ligação *versus* tempo de DM (em frames, 50 ns) do sistema com o ligante cefalotina



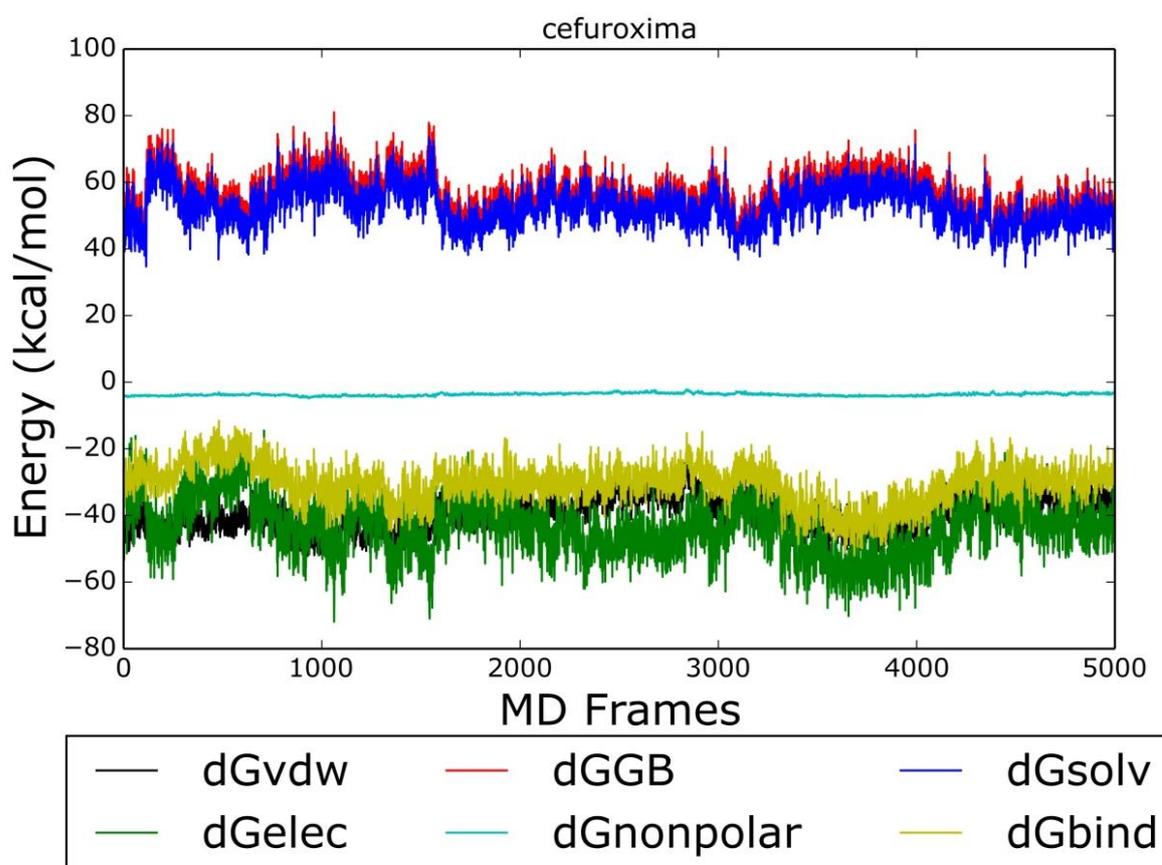
**Fonte:** dados extraídos desta pesquisa.

Observa-se que as energias de van der Waals ( $\Delta G_{vdw}$ , em preto) e eletrostática ( $\Delta G_{elec}$ , em verde) apresentaram poucas variações ao longo da DM, com energias médias de  $\Delta G_{vdw}$  igual a -39,838 Kcal/mol e  $\Delta G_{elec}$  igual a -41,658 Kcal/mol, indicando que as interações eletrostáticas e principalmente as interações de hidrogênio contribuem fortemente para o sistema na formação do complexo estável. A progressão da energia livre de ligação ( $\Delta G_{bind}$ ) durante o tempo de DM apresenta o mesmo padrão que os valores de  $\Delta G$  obtidos nos intervalos com a decomposição, ou seja, até aproximadamente 25 ns de simulação o  $\Delta G_{bind}$  mantém-se mais favorável, com valores mais negativos, do que quando comparados com os valores de  $\Delta G_{bind}$  a partir dos 25 ns. A média da energia livre de ligação para esse sistema é de -27,334 Kcal/mol, muito próximo dos valores obtidos pela

decomposição de energia, indicando que este sistema é realmente favorável para a formação de um complexo estável entre a enzima PBP5 de *E. coli* e o ligante cefalotina, afim de obter a inibição completa de sua função enzimática.

Por fim, foi gerado o gráfico de energia livre de ligação ao longo do tempo de DM (Gráfico 23) para o sistema do ligante cefuroxima.

**Gráfico 23** – Energia Livre de Ligação *versus* tempo de DM (em frames, 50 ns) do sistema com o ligante cefuroxima



**Fonte:** dados extraídos desta pesquisa.

Analisando as energias de van der Waals ( $\Delta G_{vdw}$ , em preto) e eletrostática ( $\Delta G_{elec}$ , em verde) observa-se que as trajetórias mostraram algumas variações ao longo da simulação de DM, mas que não comprometeram a estabilidade dos complexos, pois as energias médias de  $\Delta G_{vdw}$  e  $\Delta G_{elec}$  são bastante favoráveis, com -39,828 Kcal/mol e -43,692 Kcal/mol, respectivamente, sugerindo que as interações eletrostáticas e as interações que compreende as interações de van de Waals contribuem para a formação de um complexo estável. Em amarelo é representada a energia  $\Delta G$  de ligação do sistema,  $\Delta G_{bind}$ , que apresenta-se de maneira estável durante os 50 ns (5000 frames) de DM. O valor médio obtido por

esse método é de -30,675 Kcal/mol, abaixo do valor de  $\Delta G$  obtido pelo método de decomposição, mas ainda mostra-se favorável.

A tabela 5 permite comparar os valores de  $\Delta G_{\text{bind}}$  obtidos para os três sistemas.

**Tabela 5** – Energias livres de ligação ( $\Delta G_{\text{bind}}$ , em Kcal/mol) para os ligantes cefoxitina, cefalotina e cefuroxima

<b>Ligantes</b>	<b><math>\Delta G_{\text{bind}}</math> (Kcal/mol)</b>
<b>cefoxitina</b>	-28,225
<b>cefalotina</b>	-27,334
<b>cefuroxima</b>	-30,675

**Fonte:** dados extraídos desta pesquisa.

Os três valores de  $\Delta G_{\text{bind}}$  mostram-se muito favoráveis para a formação de complexos estáveis, entretanto, este não é o único fator determinante para ser analisado. As energias de interação com os resíduos catalíticos também devem ser levados em consideração na hora de sugerir o ligante mais estável para o sistema, e nessa vertente, observou-se que o ligante cefalotina obteve as melhores energias de interação com os resíduos catalíticos Ser44 e His216, e combinado ao seu valor de  $\Delta G_{\text{bind}}$  favorável e espontâneo para a formação de complexo estável, sugere-se que este ligante revelou ter caráter de inibidor mais estável para a formação do complexo e inibição da ação enzimática da PBP5 de *E. coli*.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho fez uso de técnicas de modelagem molecular para o estudo dos aspectos teóricos de antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos da classe de cefalosporinas na inibição irreversível da enzima transpeptidase PBP5 de *E. coli*, responsável pela formação da ligação cruzada de peptídeos no processo final de biossíntese do peptidoglicano da parede celular bacteriana.

Os resultados de RMSF obtidos a partir das simulações de dinâmica molecular permitiram explicar que a movimentação sofrida pelo domínio II na estrutura da proteína, onde observou-se que o padrão de flutuação em cada um dos sete sistemas estudados é muito semelhante entre si, não influencia no comportamento do domínio PB, onde ocorre a interação com o ligante no sítio ativo de ligação, pois este domínio PB se mantém altamente estável em todos os sistemas durante os 50 ns de simulação.

O estudo das energias livres de ligação permitiram verificar que os ligantes cefoxitina (cristalográfico), cefalotina e cefuroxima apresentaram ótimos valores de  $\Delta G$  obtidos pelo método de decomposição de energia livre por resíduo, com -31,471 Kcal/mol, -34,225 Kcal/mol e -35,085 Kcal/mol, respectivamente. Quando comparado às energias obtidas pelo método de energia livre de ligação ao longo da simulação, a ordem dos ligantes se altera, com -27,334 Kcal/mol para a cefalotina, -28,445 Kcal/mol para a cefoxitina e -30,675 Kcal/mol para a cefuroxima. Portanto esses complexos mostram-se mais favoráveis e espontâneos no processo de afinidade com a enzima, em comparação com os outros ligantes cefalosporínicos estudados, uma vez que as energias livres de ligação obtidas pelo método de decomposição foram numericamente mais negativas, ou seja, mais favoráveis dentre todos os sistemas. Mas deve-se levar em consideração as energias de interação por resíduo extraída dos gráficos de decomposição, visto que elas apontam qual ligante tem melhor afinidade com os aminoácidos catalíticos responsáveis pela ação enzimática da proteína trabalhada. Assim sendo, observou-se que os resíduos catalíticos Ser44 e His216 apresentaram contribuições energéticas mais favoráveis para o sistema formado pelo ligante cefalotina, antes de sofrer a mudança conformacional, com  $E_{int}$  de -4,489 Kcal/mol e -2,488 Kcal/mol, nesta ordem.

Portanto, a partir dos resultados obtidos usando a simulação de dinâmica molecular, cálculo de decomposição de energia livre por resíduo junto com cálculo de energia livre de ligação ao longo da DM, para o sistema formado com a cefalotina, juntamente com a análise de todos esses dados, sugere-se que, dentre os seis ligantes estudados, a cefalotina apresentou melhor afinidade com a enzima PBP5 de *E. coli*, podendo assim inativar a função enzimática da transpeptidase na terceira etapa de biossíntese do peptidoglicano, acarretando a morte da bactéria.

## REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, D. J.; Burger's Medicinal Chemistry & Drug Discovery. Chemotherapeutic Agents, John Wiley & Sons: San Francisco, 2003, vol. 5.
- ADCOCK, S. A.; McCAMMON, J. A. Molecular dynamics: survey of methods for simulating the activity of pro-teins. Chemical Reviews, v. 106, p. 1589-615. 2006;
- BARBOZA, H. R.; TORRES, B. B. Microbiologia Básica. São Paulo: Atheneu, 2005.196 p.
- BASAVANNACHARYA C, MOODY PR, MUNSHI T, CRONIN N, KEEP NH, BHAKTA S (2010) Essential residues for the enzyme activity of ATP-dependent MurE ligase from *Mycobacterium tuberculosis*. Protein Cell, 1:1011-1022.
- BAYLY, CI; CIEPLAK, P; CORNELL, W; KOLLMAN, PA.; A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model. J Phys Chem. 1993;97(40):10269-10280. doi:10.1021/j100142a004.
- BERENDSEN, H. J. C., POSTMA, J. P. M., GUNSTEREN, W. F. V., HERMANS, J., Interaction models for water in relation to protein hydration, in Intermolecular forces, ed. B. Pullman, D Reidel Publishing Company Dordrecht, 1981, pp. 331–342.
- BOUHSS A, TRUNKFIELD AE, BUGG TDH, MENGIN-LECREULX D (2008) The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates. FEMS Microbiology Review, 32:208-33.
- BROWN, Lisa; WOLF, Julie M.; PRADOS-ROSALES, Rafael; CASADEVALL, Arturo; (2015) Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. Nat Rev Micro, 13: 620-630.
- CASE, D.A.; DARDEN, T.A.; CHEATHAM, T.E., III; SIMMERLING, C.L.; WANG, J.; DUKE, R.E.; LUO, R.; WALKER, R.C.; ZHANG, W.; MERZ, K.M.; et al., AMBER 12; University of California: San Francisco, CA, USA, 2012.
- COATES, A. R. M.; HU, Y.; Br. J. Pharmacol. 2007, 152, 1147.
- COSTA, C. H. S.; OLIVEIRA, A. R. S.; PEREIRA, M. J. S.; FIGUEIREDO, A. F.; FERREIRA, J. E. V.; MIRANDA, R. M., Quantum Chemistry, Quantitative Structure-Activity Relationship and Molecular Docking Study on Fenarimol Derivatives with Biological Activity Against Chagas Disease. Journal of Computational and Theoretical Nanoscience, 2015.
- DeLano W. (2002) The PyMOL Molecular Graphics System. Schrödinger, LLC. (www.pymol.org).
- DEN BLAAUWEN T, de Pedro MA, Nguyen-Disteche M, Ayala JA (2008) Morphogenesis of rod-shaped sacculi. FEMS Microbiol Rev 32: 321–344.
- DIENSTMANN R., PICOLI S. U., MEYER G., SCHENKEL T., STEYER. J. (2010) Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em Enterobacteriaceae de ambiente hospitalar. J Bras Patol Med Lab. 81: 133-35.
- DOLINSKY, T. J.; NIELSEN, J. E.; MCCAMMON, J. A.; BAKER, N. A., PDB2PQR: an automated pipeline for the setup, execution, and analysis of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. Nucleic Acids Research 32 W665-W667 (2004).
- EISENSTEIN, Barry and ZALEZNIK, Dori, "Enterobacteriaceae," in Mandell, Douglas, & Bennett's PRINCIPLES AND PRACTICE OF INFECTIOUS DISEASES, Fifth Edition, Chap. 206, pp. 2294-2310 (2000).

FENG, Peter; WEAGANT, Stephen D.; GRANT, Michael A.; Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria, in BACTERIOLOGICAL ANALYTICAL MANUAL (8th ed. 2002).

FERNANDES, P.; Nat. Biotechnol. 2006, 24, 1497.

FRAIMOW, H. S.; TSIGRELIS, C., Management of Specific Resistant Pathogens. Critical Care Clinic, 2001, 27;163-205.

FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; MONTGOMERY, JR., J. A.; VREVEN, T.; KUDIN, K. N.; BURANT, J. C.; MILLAM, J. M.; IYENGAR, S. S.; TOMASI, J.; BARONE, V.; MENNUCCI, B.; COSSI, M.; SCALMANI, G.; REGA, N.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; KLENE, M.; LI, X.; KNOX, J. E.; HRATCHIAN, H. P.; CROSS, J. B.; BAKKEN, V.; ADAMO, C.; JARAMILLO, J.; GOMPERTS, R.; STRATMANN, R. E.; YAZYEV, O.; AUSTIN, A. J.; CAMMI, R.; POMELLI, C.; OCHTERSKI, J. W.; AYALA, P. Y.; MOROKUMA, K.; VOTH, G. A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J. J.; ZAKRZEWSKI, V. G.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A. D.; STRAIN, M. C.; FARKAS, O.; MALICK, D. K.; RABUCK, A. D.; RAGHAVACHARI, K.; FORESMAN, J. B.; ORTIZ, J. V.; CUI, Q.; BABOUL, A. G.; CLIFFORD, S.; CIOSLOWSKI, J.; STEFANOV, B. B.; LIU, G.; LIASHENKO, A.; PISKORZ, P.; KOMAROMI, I.; MARTIN, R. L.; FOX, D. J.; KEITH, T.; AL-LAHAM, M. A.; PENG, C. Y.; NANAYAKKARA, A.; CHALLACOMBE, M.; GILL, P. M. W.; JOHNSON, B.; CHEN, W.; WONG, M. W.; GONZALEZ, C.; AND POPLE, J. A.; Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2004.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T, ANTIBIÓTICOS: IMPORTÂNCIA TERAPÊUTICA E PERSPECTIVAS PARA A DESCOBERTA E DESENVOLVIMENTO DE NOVOS AGENTES. Quim. Nova, Vol. 33, No. 3, 667-679, 2010.

HANWELL, M. D.; CURTIS, D. E.; LONIE, D. C.; VANDERMEERSCH, T.; ZUREK, E.; HUTCHISON, G. R.; J. Cheminformatics 2012, 4:17.

H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne. (2000) The Protein Data Bank Nucleic Acids Research, 28: 235-242. Disponível em: [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org).

HOU, T.; WANG, J.; LI, Y.; WANG, W., Assessing the performance of the MM/PBSA and MM/GBSA methods. 1. The accuracy of binding free energy calculations based on molecular dynamics simulations. J Chem Inf Model. 2011, 51(1): 69-82.

HORNAK, V.; ABEL, R.; OKUR, A.; et al., Comparison of Multiple Amber Force Fields and Development of Improved Protein Backbone Parameters, Proteins, 65 2006; 65: 712-725.

HUMPHREY, W., DALKE, A. AND SCHULTEN, K., "VMD – Visual Molecular Dynamics" J. Molec. Graphics 1996, 14.1, 33-38.

JAWETZ, E. et al. Microbiologia medica. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 524 p.

JORGENSEN, W.; CHANDRASEKHAR, J.; MADURA, J.; IMPEY, R.; KLEIN, M. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. J. Chem. Phys. 1983, 79, 926–935.

KAPER JB, NATARO JP, MOBLEY HL. Pathogenic Escherichia coli. Nat Rev Microbiol. 2004;2:123-40.

KAYSER, F. H. Medical Microbiology. New York: Thieme, 2005, 698 p.

KONEMAN, E. et al. Diagnostico microbiologico: Texto e atlas colorido. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. 1465 p.

KOLLMAN, P.A.; MASSOVA, I.; REYES, C.; KUHN, B.; HUO, S; CHONG, L.; LEE, M.; LEE, T.; DUAN, Y.; WANG, W.; DONINI, O.; CIEPLAK, P.; SRINIVASAN, J.; CASE, D.A.; CHEATHAM, T. E., Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models. *Acc Chem Res.* 2000, 33(12): 889-897.

LAMICHHANE G, FREUNDLICH JS, EKINS S, WICKRAMARATNE N, NOLAN ST, BISHAI WR (2011) Essential metabolites of *Mycobacterium tuberculosis* and their mimics. *mBio*, 2:e00301e00310.

LAMPING, N. et al. LPS-binding Protein Protects Mice from Septic Shock Caused by LPS or Gram-negative Bacteria. *J. Clin. Invest.*, v. 101, n. 10, p. 2065–2071, 1998.

LEVINSON, W.; JAWETZ, E. *Microbiologia Médica e Imunologia*. 4. Ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1998. 415 p.

LEVY, S. B.; *Clin. Infect. Dis.* 2001, 33, S124; Demain, A. L.; *Nat. Biotechnol.* 2002, 20, 331 ; Woodford, N.; *Clin. Microbiol. Infec.* 2005, 11, 2.

LIVERMORE, D. M., & WILLIAMS, J. D. (1996).  $\beta$ -Lactams: mode of action and mechanisms of bacterial resistance. In *Antibiotics in Laboratory Medicine*, (Lorian, V., Ed.), pp. 502-78. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.

LUZHETSKYY, A.; PELZER, S.; BECHTHOLD, A.; *Curr. Opin. Investig. D* 2007, 8, 608.

MAJOREK, Karolina A.; KUHN, Misty L.; CHRUSZCZ, Maksymilian; ANDERSON, Wayne F.; MINOR, Wladek. Structural, Functional, and Inhibition Studies of a Gcn5-related N-Acetyltransferase (GNAT) Superfamily Protein PA4794: A NEW C-TERMINAL LYSINE PROTEIN ACETYLTRANSFERASE FROM PSEUDOMONAS AERUGINOSA. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 288, no. 42, pp. 30223–30235, 2013.

MARTINEZ, J. L., The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proceedings of the Royal Society B*, 2009, 276:2521-2530.

MASSOVA, I.; KOLLMAN, P. A. Combined molecular mechanical and continuum solvent approach (MM-PBSA/GBSA) to predict ligand binding. *Perspect. Drug Discovery Des.* 2000, 18, 113–135.

MIMS, C.A., PLAYFAIR, J.H., ROITT, I.M., WAKELIN, D., WILLIAMS, R. *Microbiologia médica*. São Paulo: Manole, 1995, p.18-38.

MORAN, Laurence A; HORTON, H. Robert; SCRIMGEOUR, K. Gray; PERRY, Marc. D. *Principles of Biochemistry*. Fifth Edition;

MURRAY, P.R., DREW, W.L., KOBAYASHI, G.S., THOMPSON, J.K. *Microbiologia médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 5.ed, 2005.

MURRAY, P.R.; ROSENTAHL, K. S.; PFALLER, M. A. *Microbiologia Médica*, 5 ed. Madrid: Elsevier, 2006, 976 p.

NAMBA, A. M; SILVA, V. B; SILVA, C. H. T P. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. *Ecl. Quím. São Paulo*, 33(4): 13-24, 2008;

NICOLA, George; TOMBERG, Joshua; PRATT, R. F.; NICHOLAS, Robert A.; DAVIES, Christopher. Crystal structures of covalent complexes of  $\beta$ -lactam antibiotics with *E. coli* penicillin-

binding protein 5: toward an understanding of antibiotic specificity. *Biochemistry*. 2010; 49(37): 8094–8104.

NICOLAOU, K. C.; MONTAGNON, T.; *Molecules that Changed the World*, Wiley-VCH: Weinheim, 2008, cap. 13.

NICHOLAS RA, KRINGS S, TOMBERG J, NICOLA G, DAVIES C., Crystal structure of wild-type penicillin-binding protein 5 from *E. coli*: Implications for deacylation of the acyl-enzyme complex. *J. Biol. Chem.* 2003; 278:52826–52833.

PAYNE, D. J.; GWYNN, M. N.; HOLMES, D. J.; PAMPLIANO, D. L.; *Nat. Rev. Drug Discovery* 2007, 6, 29.

PATRICK, G. L.; *An Introduction to Medicinal Chemistry*, Oxford University Press: New York, 1995, cap. 10.

PATRICK, G. L.; *An Introduction to Medicinal Chemistry*, Oxford University Press: New York, 2005, cap.16.

PELCZAR JR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R.; *Microbiology: concepts and applications*; McGrawHill; 1993; 75-76 pp.

Pin-Chih Su, Cheng-Chieh Tsai, Shahila Mehboob, Kirk E. Hevener, and Michael E. Johnson. Comparison of Radii Sets, Entropy, QM Methods, and Sampling on MM-PBSA, MM-GBSA, and QM/MM-GBSA Ligand Binding Energies of *F. tularensis* Enoyl-ACP Reductase (FabI). *Journal of Computational Chemistry*, 2015, 36,1859-1873.

POTLURI L, KARZMAREK A, VERHEUL J, PIETTE A, WILKIN JM, WERTH N, BANZHAF M, VOLLMER W, YOUNG KD, NGUYEN-DISTECHE M, DEN BLAAUWEN T. Septal and lateral wall localization of PBP5, the major D,D-carboxypeptidase of *Escherichia coli*, requires substrate recognition and membrane attachment. *Mol Microbiol.* 2010;77:300–323.

PUPO, M. T.; GUIMARÃES, D. O.; FURTADO, N. A. J. C.; BORGES, W. S. *Em Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry*; Taft, C. A., ed.; Research Signpost: Kerala, 2006, cap. 4.

RANG, H.P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. *Farmacologia*. 3.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1997. Cap. 42.

RIBEIRO, M. C.; SOARES, M. M. S. R.; *Microbiologia prática: roteiro e manual*; Atheneu; 1993; 5-8pp.

RIVAS M, SOSA-ESTANI S, RANGEL J, CALETTI MG, VALLÉS P, ROLDÁN CD, et al. Risk factors for sporadic Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in children, Argentina. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14(5):763.

RYAN, K. J.; RAY, C. G. *Sherris Medical microbiology: an introduction to infectious disease* . 4. ed. McGraw-Hill, 2004, 979 p.

RYCKAERT J-P, Ciccotti+ G, Berendsen HJC. Numerical integration of the Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints: Molecular Dynamics of n-Alkanes. *J Comput Phys.* 1977;23:321-341. <http://physics.ujep.cz/~mlisal/md/shake.pdf>. Accessed June 25, 2017.

SAUVAGE M, FORTIN NJ, OWENS CB, YONELINAS AP, EICHENBAUM H. Recognition memory opposite effects of hippocampal damage on recollection and familiarity. *Nat Neurosci.* 2008;11:16–18.

SCHLEIFER K H, KANDLER O (1972) Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriological Reviews*, 36:407-477.

SIEFFERT, N.; WIPFF, G. The [BMI][Tf2N] ionic liquid/water binary system: A molecular dynamics study of phase separation and of the liquid-liquid interface. *Journal of Physical Chemistry B*, v.110, n.26, p.13076-13085, 2006;

SIPERSTEIN, M. D, GUEST, M. J. Studies on the site of the feedback control of cholesterol synthesis. *J Clin Invest* 1960; 39:642-5;

SUARÉZ, C.; GUDIOL, F.; *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2009, 27, 116.

TORTORA, G. et al. *Microbiologia*. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 894 p.

TORTORA, Gerard J., FUNKE, Berdell R., CASE, Christine L. *Microbiologia*, 10.ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 894p.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N.; *Microbiologia*. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1999.

TRABULSI, L. R. et al. *Microbiologia*. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 760 p.

TRIASSI, Alexander J.; WHEATLEY, Matthew S.; SAVKA, Michael A.; GAN, Han Ming; DOBSON, Renwick C. J.; HUDSON, André O., L,L-diaminopimelate aminotransferase (DapL): a putative target for the development of narrow-spectrum antibacterial compounds. *Frontiers in Microbiology*, v. 5, p. 509, 2014.

TSUI, V.; CASE, D. A., Theory and applications of the generalized Born solvation model in macromolecular simulations. *Biopolymers*. 2000, 56(4): 275-291.

ULMER, A.J. Induction of proliferation and cytokine production in human T lymphocytes by lipopolysaccharide (LPS). *Toxicology*, v. 152, p. 37 - 45, 2000.

VAN HEIJENOORT J (2001) Recent advances in the formation of the bacterial peptidoglycan monomer unit. *Natural Product Reports*; 18:503-19.

VERLI, Hugo. *Bioinformática da Biologia à flexibilidade molecular*. Porto Alegre, 2014. 282 p.: il;

VOET, D., VOET, J.G., PRATT, C.W. *Fundamentos de bioquímica*. Porto Alegre: Artmed, 2000;

VON NUSSBAUM, F.; BRANDS, M.; HINZEN, B.; WEIGAND, S.; HÄBICH, D.; *ANGEW. Chem., Int. Ed.* 2006, 45, 5072.

WALSH, C.; *Antibiotics: Actions, Origins, Resistance*, ASM Press: Washington, 2003.

WANG, J. M.; WOLF, R. M.; CALDWELL, J. W.; et al., Development and Testing of a General Amber Force Field, *J. Comput.Chem.*, 25 2004; 25: 1157-1174.

WILKE, M. S. et al.  $\beta$ -Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Curr. Opin. Microbiol.* v. 8, p. 525-533, 2005.

WILLIAMS, J.D.  $\beta$ -lactamases and  $\beta$ -lactamase inhibitors. *Inter. J. Antimicrob. Agents*, 12: 3-7, 1999.

ZAPUN A, CONTRERAS-MARTEL C, VERNET T. Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance. *FEMS Microbiol Rev.* v.32, p.361-85, 2008.

## Theoretical aspects of the interaction between cephalosporin compounds and *Escherichia coli* Penicillin Binding Protein 5 using Molecular Dynamics.

Cite this: DOI: 10.1039/x0xx00000x

Received 00th January 2018,  
Accepted 00th January 2018

DOI: 10.1039/x0xx00000x

[www.rsc.org/](http://www.rsc.org/)

Amanda. R. S. Oliveira<sup>a,b,c</sup>, Clauber. H. S. da Costa<sup>b,c</sup>, Agnaldo da S. Carneiro<sup>b</sup>,  
Carlos A. L. Barros<sup>a</sup>

*Escherichia coli* is an anaerobic Gram-negative bacillus that naturally inhabits the intestines of mammals. The diseases arise when the bacteria reaches other organs of our body, causing infections, mainly in the urinary tract of women, due to the proximity of the female urethra with the anus. Antibiotics were used in the treatment of these infections, such as antibiotics of the cephalosporin class, which are the group with the highest number of  $\beta$ -lactam antibiotics in clinical use. These compounds can inhibiting the enzymatic function of Penicillin-Binding Proteins (PBP), which is responsible for the final step of biosynthesis of peptidoglycan, an essential component for the survival of bacteria. In this work the antimicrobial compounds cefoxitin e cephalothin were chosen based on experimental studies of biological activity in the fight against the opportunistic Gram-negative pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. These compounds were studied theoretically through Molecular Dynamics simulations, Binding Free Energy calculations, and Interaction Energy per Residue calculations, for the determination of their potential biological activity in inhibiting the enzymatic function of *E. coli* specific PBP, Penicillin Binding Protein 5 (PBP5), therefore its inhibition leads to cell death. The more favorable binding free energy was obtained for the cephalothin, -34.225 Kcal/mol, and it was observed that the catalytic residues Ser44 and His216 presented more favorable energy contributions to the system formed by the cephalothin ligand. Thus, it was suggested that cephalothin has excellent potential for inhibition of the enzymatic function of *E. coli* PBP5.

### Introduction

The Penicillin-Binding Proteins (PBP) were a family of transpeptidases, which have the function of catalyzing cross-peptide bonds between glycosidic ribbons through the action of a serine residue at its active site, in the final biosynthesis process of bacterial cell wall peptidoglycan layers<sup>1,2</sup> (Figura 1a).

Peptidoglycan is a polymer made up of sugars and amino acids, called N-acetylglucosamine (GlcNac) and N-acetylmuramic acid (MurNac), cross-linked ( $\beta$ -1,4) between amino acids of different peptide chains, resulting in a a strong, rigid three-dimensional polymer that forms a mesh-like layer outside the cytoplasmic membrane of the bacterium, which forms part of the bacterial cell wall.

The peptidoglycan layer is structurally thicker in Gram positive bacteria, representing approximately 90% of the total weight of the bacterium, as compared to the 5-10% Gram negative, which has the structural and chemically more complex cell wall.

*Escherichia coli* is a gram negative and anaerobic enterobacterium that naturally inhabits the intestines of mammals. It can cause diseases when it reaches other organs of our body, causing infections, mainly in the urinary

<sup>a</sup> Laboratório Amazônico de Computação Científica, Universidade Federal do Pará, CEP 66075-110 Belém, PA, Brazil.

<sup>b</sup> Laboratório Computacional de Sistemas Biológicos, Universidade Federal do Pará, CEP 66075-110 Belém, PA, Brazil.

<sup>c</sup> Laboratório de Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos, Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Federal do Pará, CEP 66075-110 Belém, PA, Brazil.

tract of women, due to the proximity of the female urethra with the anus. *E. coli* infection may occur through the consumption of water or food contaminated with fecal coliforms containing the bacterium.

PBP has a high binding affinity for  $\beta$ -lactam antibiotics, which have the ability to inhibit their enzymatic function by covalently binding to the serine residue<sup>3,4</sup>, therefore  $\beta$ -lactam antibiotics of the cephalosporin class in the treatment of these infections to fight the bacteria (Figura 1b).

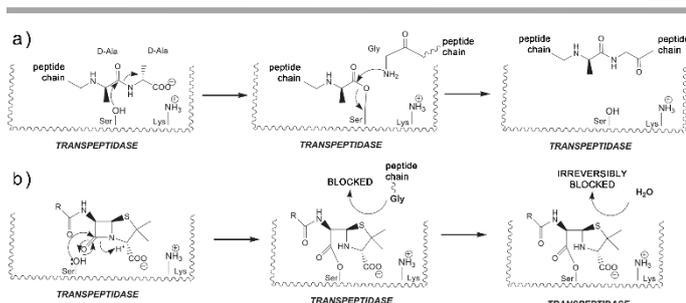


Figure 1: (a) mechanism transpeptidase catalyzed, for the cross-formation between peptide chains of the bacterial cell wall; (b) irreversible inhibition of transpeptidase by  $\beta$ -lactam antibiotics.

Penicillin Binding Protein 5 (PBP5)<sup>5</sup> is the major *E. coli* PBP found in the Protein Data Bank (PDB)<sup>6</sup> under the code 3MZE<sup>7</sup>. The interaction of these enzymes with  $\beta$ -lactam antibiotics inactivates their function in the final biosynthesis phase of peptidoglycan, forming a weakly reticulated layer, and causing irregularities in the cell wall structure, which causes the bacteria to grow highly susceptible to lysis and cell death<sup>8</sup>.

The potential biological activity of  $\beta$ -lactam antimicrobial compounds in the fight against *E. coli* through the inhibition of PBP5 was based on the biological activity experimentally proven in the study by Majorek et al., In 2013<sup>9</sup>, with the bacterium, also Gram negative, *Pseudomonas aeruginosa*, an opportunistic pathogen that explores eventual weaknesses of the body to establish a picture of infection. Therefore, PBP5 is a promising target in the treatment of infections caused by *E. coli*, since the inhibition of this protein through the interaction with  $\beta$ -lactam antibiotics can cause the death of the bacterium.

Therefore, it was performed Molecular Dynamics simulations (MD), Binding Free Energy calculations and Interaction Energy per Residue, for the systems PBP5-cefoxitin and PBP5-cefalotin. In order to evaluate the stability and spontaneity of the complexes, to determine which residues contribute favorably to the systems and finally suggest the most stable compound for the inhibition of the enzymatic action of PBP5.

## Methodology

### Molecular Dynamics Simulation

The Molecular Dynamics (MD) simulations were performed in the AMBER12<sup>10</sup>. The ionization state of ionizable residues was evaluated from PROPKA3<sup>11</sup>. First the compounds cefoxitin and cephalothin were subjected to the calculation of RESP charges<sup>12</sup> using the Gaussian03<sup>13</sup> program with the Hartree-Fock method and the set of bases 6-31G\*, later extracted using the antechamber module, implemented in the AMBER12 package. The general force field of AMBER (GAFF)<sup>14</sup> and force field ff99SB<sup>15</sup> were used to describe the collection of atoms of the system by Newtonian forces by the LEaP tool<sup>14</sup> in AMBER12. The complexes PBP5-cefoxitin and PBP5-cephalothin were solvated with octahedral TIP3P<sup>16</sup> molecules of water, and the systems were neutralized with a Na<sup>+</sup> ion. To minimize the contacts and the energy content of the system, we minimize the hydrogen atoms, water molecules and against ions, and finally we apply minimization to the whole system. The systems were heated through 50 picoseconds (ps) of molecular dynamics in order to increase its temperature to 300 K with position restrictions at constant volume, applying the Shake algorithm<sup>17</sup>. Then, 1000 ps of dynamics were performed with canonical ensemble, that is, with P (1atm), T (300K) and N constants, in order to establish the balance of the system. Finally, we performed 50 nanoseconds (ns) of molecular dynamics simulations for two complexes. RMSD (Root Mean Square Deviation) graphs were generated to analyze the equilibrium and stability of the ligand atoms and the protein structure during the MD trajectories.

### Interaction Energy per Residue and Binding Free Energy

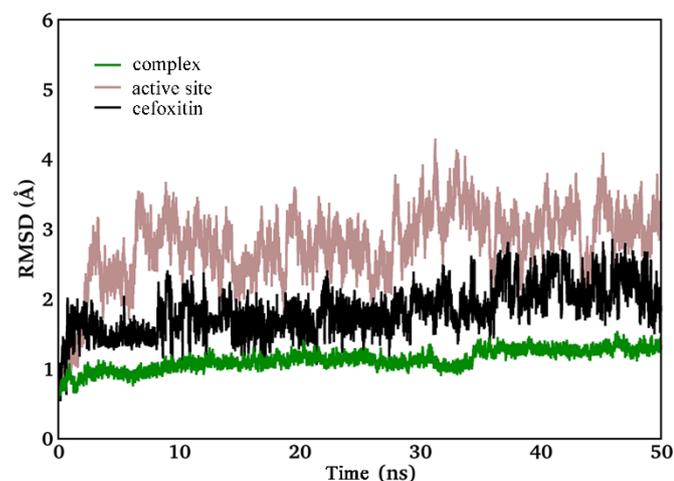
The Interaction Energy per Residue was calculated by applying the MM/GBSA method using the AMBER12<sup>18, 19</sup> protocol, according to the equation:

$$\Delta G_{inhibitor-residue} = \Delta E_{electrostatic} + \Delta E_{vdW} + \Delta G_{polar} + \Delta G_{n-polar} \quad \text{Eq. 1}$$

where the term  $\Delta G_{inhibitor-residue}$  indicates that the interaction energy between inhibitor-residue is described by the electrostatic contribution ( $\Delta E_{electrostatic}$ ) and van der Waals ( $\Delta E_{vdW}$ ) in vacuum, and polar ( $\Delta G_{polar}$ ) and non-polar ( $\Delta G_{n-polar}$ ) solvation.

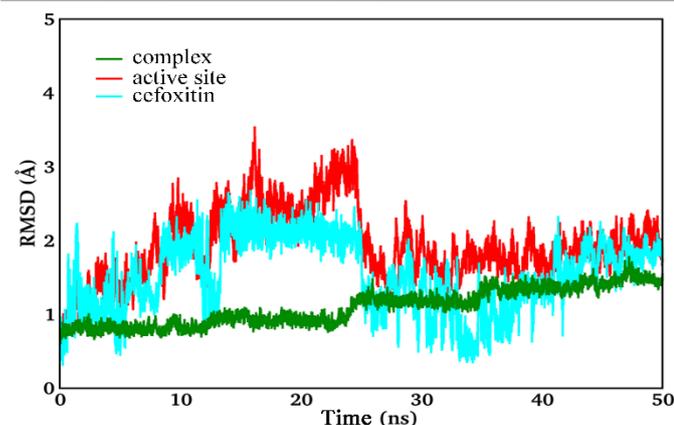
## Results and Discussion

Analysis of the RMSD graphics of the PBP5-cefoxitin system (Graphic 1) revealed the great stability of the complex trajectory, with only 1 Å of variation. The trajectory of cefoxitin underwent some deviations during the 50 ns of MD, with small variations of 2.6 Å in the RMSD (Å) axis, and maintains the stability with average variation of 2 Å. But was observed that the interaction with the Ser44 catalytic residue is not so stable, with a mean distance of 3.84 Å.



Graphic 1: RMSD (in Å) of the PBP5- cefoxitin system versus Time of MD (in ns).

The trajectory of the PBP5-cephalothin complex shows a system without large deviations, with RMSD between 1 Å and 1.5 Å, indicating to be a very stable system (Graphic 2). The active site has a behavior similar to that of the binder, where at 25 ns both trajectories undergo a change.



Graphic 2: RMSD (in Å) of the PBP5-cephalothin system versus the time of DM (in ns).

The figure 2 shows the conformational change occurring at 25 ns MD, where the structures with the blue carbon atoms represent the conformations before 25 ns, and the pink structures represent the conformations after 25 ns. It is possible to visualize that some highlighted residues of the active site underwent small-scale conformational changes, as is the case of Asn112 and other residues that did not show significant changes, but also there were larger conformational and spatial changes, as observed for Lys84, Arg198, His216 and Thr217 residues, which showed rotation of their side chains. These conformational variations caused the stabilization of the site, with low RMSD value after the highlighted moment. It was observed

that the cephalothin structure remained closed before 25 ns (blue), after that the ligand passed to the more open conformation (pink) and remained so until the end of the MD. This clearly observed change in the RMSD trajectory of cephalothin influenced its greater stability, maintaining the average variation in 1.35 Å, but altered the interactions with catalytic residues, with a mean distance of 3.48 Å in relation to the catalytic residue Ser44.

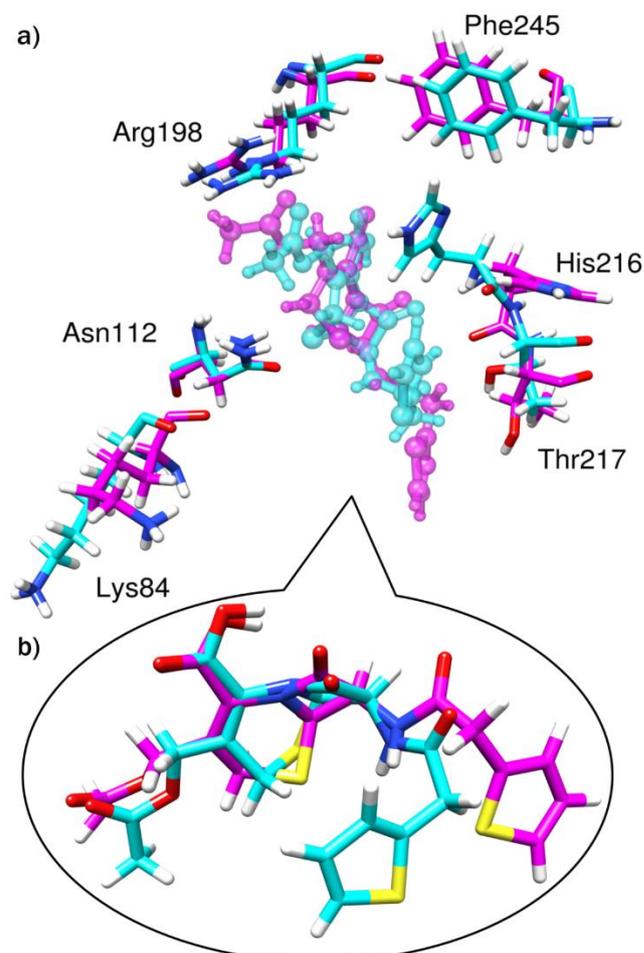
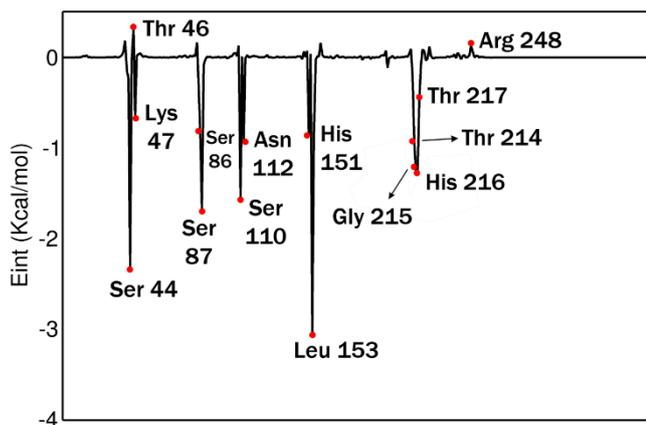


Figure 2: Conformational change occurred in approximately 25 ns DM; (a) structure of the active site binding site before (blue color) and then (pink color) of the conformational change; (b) structure of the cephalothin ligand before (blue color) and then (pink color) of the conformational change

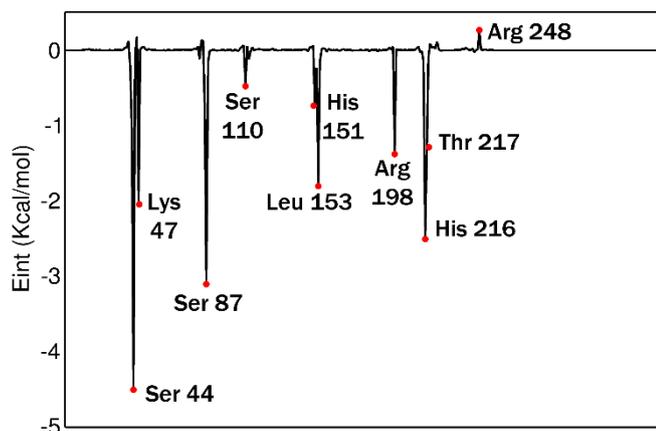
The graphic 3 shows the result of Interaction Energy per Residue for the PBP5-cefoxitin system, where the negative values in the Y-axis of the graph for the interaction energies ( $E_{int}$ , in Kcal/mol) represent favorable energies for the system, while that the positive values, in this same axis, represent unfavorable energies. It was observed that the most favorable energy contribution is related to the residue

Leu153, with energy of -3,053 Kcal/mol, accompanied by the catalytic Ser44, which has -2,329 Kcal/mol, demonstrating that cefoxitin exerts good interactions within the active site. It was also observed that catalytic Thr46 and Arg248 residues have an unfavorable energy contribution to the system.



Graphic 3: Interaction energies ( $E_{int}$ , in Kcal/mol) for the PBP5-cefoxitin system.

From graph 4 it was observed that the catalytic residue Ser44 has interaction energy equal to -4.489 Kcal/mol with cephalothin, demonstrating strong attraction during the simulation. Other residues also showed strong interaction energies with cephalothin, indicating the good stability of the ligand in the complex.



Graphic 4: Interaction energies ( $E_{int}$ , in Kcal/mol) for the PBP5-cephalothin system.

The  $\Delta G_{bind}$  values for the PBP5-cefoxitin and PBP5-cephalothin systems were listed in Table 1.

Ligantes	$\Delta G_{bind}$ (Kcal/mol)
cefoxitina	-31,471
cefalotina	-34,225

Table 1: Free energy to PBP5-cefoxitin and PBP5-cephalothin systems.

These values were very favorable for the formation of stable complexes, following the trend of the energy values of interaction with the catalytic residue Ser44, where it was observed that the cephalothin binder obtained the best interaction energies as well as the value of  $\Delta G_{bind}$  for the PBP5-cephalothin system is more favorable and spontaneous for stable complex formation.

## Conclusion

From the analysis of the results of MD and Interaction Energy per Residue calculations for the PBP5-cefoxitin and PBP5-cefalotin systems, it is possible to observe that the PBP5-cephalothin system presented more stable interaction energy. Therefore, it was suggested that this system has greater affinity with the enzyme PBP5 of *E. coli*, being able to inactivate the enzymatic function of the transpeptidase in the third step of biosynthesis of peptidoglicano, causing the death of the bacterium.

## References

- DEN BLAAUWEN T, de Pedro MA, Nguyen-Disteche M, Ayala JA (2008) Morphogenesis of rod-shaped sacculi. FEMS Microbiol Rev 32: 321–344.
- POTLURI L, KARCZMAREK A, VERHEUL J, PIETTE A, WILKIN JM, WERTH N, BANZHAF M, VOLLMER W, YOUNG KD, NGUYEN-DISTECHE M, DEN BLAAUWEN T. Septal and lateral wall localization of PBP5, the major D,D-carboxypeptidase of Escherichia coli, requires substrate recognition and membrane attachment. Mol Microbiol. 2010;77:300–323.
- SAUVAGE M, FORTIN NJ, OWENS CB, YONELINAS AP, EICHENBAUM H. Recognition memory opposite effects of hippocampal damage on recollection and familiarity. Nat Neurosci. 2008;11:16–18.
- ZAPUN A, CONTRERAS-MARTEL C, VERNET T. Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance. FEMS Microbiol Rev. v.32, p.361-85, 2008.
- NICHOLAS RA, KRINGS S, TOMBERG J, NICOLA G, DAVIES C., Crystal structure of wild-type penicillin-binding protein 5 from *E. coli*: Implications for deacylation of the acyl-enzyme complex. J. Biol. Chem. 2003; 278:52826–52833.
- H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne. (2000) The

- Protein Data Bank Nucleic Acids Research, 28: 235-242. Disponível em: [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org).
- 7 NICOLA, George; TOMBERG, Joshua; PRATT, R. F.; NICHOLAS, Robert A.; DAVIES, Christopher. Crystal structures of covalent complexes of  $\beta$ -lactam antibiotics with E. coli penicillin-binding protein 5: toward an understanding of antibiotic specificity. *Biochemistry*. 2010; 49(37): 8094–8104.
- 8 WILKE, M. S. et al.  $\beta$ -Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Curr. Opin. Microbiol.* v. 8, p. 525-533, 2005.
- 9 MAJOREK, Karolina A.; KUHN, Misty L.; CHRUSZCZ, Maksymilian; ANDERSON, Wayne F.; MINOR, Wladek. Structural, Functional, and Inhibition Studies of a Gcn5-related N-Acetyltransferase (GNAT) Superfamily Protein PA4794: A NEW C-TERMINAL LYSINE PROTEIN ACETYLTRANSFERASE FROM PSEUDOMONAS AERUGINOSA. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 288, no. 42, pp. 30223–30235, 2013.
- 10 CASE DA, Cheatham TE, Darden T, et al. The Amber biomolecular simulation programs. *J Comput Chem*. 2005;26(16):1668-1688. doi:10.1002/jcc.20290.
- 11 OLSSON MHM, S?ndergaard CR, Rostkowski M, Jensen JH. PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical p K a Predictions. *J Chem Theory Comput*. 2011;7(2):525-537. doi:10.1021/ct100578z.
- 12 BAYLY CI, Cieplak P, Cornell W, Kollman PA. A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model. *J Phys Chem*. 1993;97(40):10269-10280. doi:10.1021/j100142a004.
- 13 GAUSSIAN Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, Jr., J. A.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; and Pople, J. A.; Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2004.
- 14 WANG, J. M.; WOLF, R. M.; CALDWELL, J. W.; et al., Development and Testing of a General Amber Force Field, *J. Comput.Chem.*, 25 2004; 25: 1157-1174.
- 15 HORNAK, V.; ABEL ,R.; OKUR, A.; et al., Comparison of Multiple Amber Force Fields and Development of Improved Protein Backbone Parameters, *Proteins*, 65 2006; 65: 712-725.
- 16 JORGENSEN, W.; CHANDRASEKHAR, J.; MADURA, J.; IMPEY, R.; KLEIN, M. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* 1983, 79, 926–935.
- 17 RYCKAERT J-P, Ciccotti+ G, Berendsen HJC. Numerical integration of the Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints: Molecular Dynamics of n-Alkanes. *J Comput Phys*. 1977;23:321-341. <http://physics.ujep.cz/~mlisal/md/shake.pdf>. Accessed June 25, 2017.
- 18 KOLLMAN, P.A.; MASSOVA, I.; REYES, C.; KUHN, B.; HUO, S; CHONG, L.; LEE, M.; LEE, T.; DUAN, Y.; WANG, W.; DONINI, O.; CIEPLAK, P.; SRINIVASAN, J.; CASE, D.A.; CHEATHAM, T. E., Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models. *Acc Chem Res*. 2000, 33(12): 889-897.
- 19 TSUI, V.; CASE, D. A., Theory and applications of the generalized Born solvation model in macromolecular simulations. *Biopolymers*. 2000, 56(4): 275-291.